



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553801_0064

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr.H.SCHWIEGK

Zur Frage der Spezifität und der
Beeinflussung der humoralen Antikörperbildung
eines heterologen Antilymphocytenserums

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian M o r e l l
aus Ottfingen

München

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Knedel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Schwiegk
Dekan:	Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	20.4.1971



GLIEDERUNG

- I. Einleitung
- II. Fragestellung
- III. Methodik
 1. Gesamteiweißbestimmung
 2. Elektrophorese
 3. Immunelektrophorese
 4. Modifizierte Immunelektrophorese nach OSSERMAN
 5. Doppeldiffusionstest nach
 - a) OUCHTERLONY
 - b) FEINBERG
 6. Sedimentationsanalytische Untersuchungen
 7. Herstellung von Antiseren
 8. Absorption des Immuserums mit Organextrakten
- IV. Ergebnisse
 1. Veränderung der Pferde- γ -Globuline während der Immunisierung mit Hundelymphozyten.
 - a) elektrophoretische Befunde
 - b) sedimentationsanalytische Untersuchungen
 - c) immunelektrophoretische Befunde
 2. Untersuchungen über die Spezifität präzipitierender Antikörper im Pferde-Anti-Hunde-Lymphocyten-Serum (PAHLS)
 - a) Voruntersuchungen
 - b) Identifizierung von Hundeantigenen, gegen welche die präzipitierenden Antikörper des PAHLS gerichtet sind.
 - c) Synopsis von Ouchterlony-Testen zur Untersuchung der Identität der gebildeten Präzipitationslinien.
 - d) Absorptionsversuche zur Prüfung auf Organspezifität.
 - e) Individuum-, Rassen- und Artspezifität der präzipitierenden Eigenschaften im PAHLS

3. Beobachtungen der Antikörperbildung und des Verhaltens der Immunglobuline beim Hund während der Behandlung mit PAHLS
- a) Antikörper des Hundes gegen das injizierte PAHLS
 - b) Verhalten der Immunglobuline des Hundeserums während der Behandlung mit PAHLS
 - c) Nachweis des injizierten PAHLS im Hundeserum

V. Diskussion

- 1. Kontrolle des Immunisierungsverlaufs beim Pferd
- 2. Antikörperspezifität im PAHLS
- 3. Wirkung des PAHLS auf das humorale Abwehrsystem des Hundes
- 4. Neue Anwendungsgebiete von Antilymphozytenseren, Theorien zum Wirkungsmechanismus.

VI. Zusammenfassung

I. E i n l e i t u n g

- I. Am 7. März 1902 berichtete der Wiener Privatdozent für Chirurgie Dr. Emmerich ULLMANN (85) in der k. u. k. Gesellschaft der Ärzte über seine experimentuelle Nierentransplantation. Er hatte Hundenieren autolog und heterotop an den Hals verpflanzt und in einem Falle eine 5-tägige Funktion des Transplantates erzielt. 10 Jahre später konnte SCHÖNE (72) aufgrund seiner Untersuchungen zeigen, daß es eine Transplantationsimmunität gibt. Er konnte nachweisen, daß Homotransplantate grundsätzlich abgestoßen werden und daß die Stärke der Abstoßung im umgekehrten Verhältnis zum Verwandtschaftsgrad von Spender und Empfänger steht.

Inzwischen sind die rein technischen Probleme der homologen Nierentransplantation gelöst. Organisatorische, ethische und juristische Gesichtspunkte erschweren dabei die chirurgischen Maßnahmen. Bezüglich der Organgewinnung und der biologischen Abwehrreaktion des Organismus gegen Fremdgewebe bestehen noch offene Fragen. Das Hauptproblem bei der Organverpflanzung liegt letztlich auf dem immunologischen Sektor.

Ein homologes Organ wird u n b e h a n d e l t stets nach einigen Tagen infolge einer beim Empfänger hervorgerufenen Immunreaktion abgestoßen, es sei denn zwischen Spender und Empfänger läge eine vollständige Kompatibilität vor, wie sie z.B. bei eineiigen Zwillingen besteht. Zur Lösung der immunologischen Probleme bei der Organtransplantation bieten sich theoretisch folgende Möglichkeiten:

1. Verhinderung der Immunreaktion im Empfängerorganismus.
 2. Abschwächung der Antigenwirksamkeit des Spenderorgans.
 3. Auswahl von Spender und Empfänger nach maximaler Antigenverwandtschaft.
 4. Erzeugung einer aktiven Toleranz beim Empfänger.
- Die Möglichkeiten 1. und 3. gelten als die aussichtsreichsten Punkte.

In den letzten Jahren beschäftigte sich die Transplantationsforschung intensiv mit der Verbesserung der immunsuppressiven Methoden.

Alle Verfahren - wie Ganzkörperstrahlungsbestrahlung, Chemotherapie mit alkylierenden Substanzen, Antimetaboliten, Antimitotica und Steroiden, sowie Lymphdrainage (82, 74, 2, 5), oder eine Kombination dieser Methoden - haben jedoch den Nachteil, daß sie auch die normale Immunreaktion bzw. die Bildung von Immunglobulinen, die für die physiol. Abwehrreaktion notwendig sind, unterdrücken. Die resultierende humorale Abwehrschwäche ist eine der wesentlichen Ursachen gehäufte Infektionen beim Empfänger. Andererseits ist aber auch bekannt, daß homotransplantierte Hautlappen von gesunden Individuen auf agammaglobulinaemischen Patienten nicht wie üblich abgestoßen werden (23, 24, 25).

Nachdem die Bedeutung der kleinen Lymphozyten für die zelluläre und humorale Abwehrreaktion bekannt geworden war (33, 68, 38, 8, 27, 26), lag der Gedanke nahe, durch Zerstörung oder Verminderung der Lymphozyten die immunologischen Vorgänge zu beeinflussen und dadurch eine Verlängerung der Toleranz von Homotransplantaten zu erzielen. Schon 1899 beschrieb METCHNIKOFF (51) als Erster eine Zerstörung weißer Blutzellen mit Hilfe immunologischer Mechanismen. Es gelang ihm mit Hilfe heterologer Antisera gegen Milz- und Lymphknotenzellen polymorphkernige Leukozyten der Spendertiere zu agglutinieren und zu zerstören. In der Folgezeit wurde eine Reihe von Studien über in vitro- (BESREDKA (4), CHRISTIAN u. LEEN (12), PAPPENHEIMER (60) - und in vivo - Eigenschaften derartiger Seren veröffentlicht (FLEXNER (21), CHEW u. LAWRENCE (10), CRUIKSHANK (13), WOODRUFF u. FORMAN (92), INDERBITZEN (39) und WILHELM u. Mitarb. (89)). Dabei stellte sich eine eindeutige lymphopenische Wirkung der Antisera heraus. 1960/1961 wurden erste Versuche unternommen, mittels heterologer Antilymphozytensera Abstoßungsreaktionen gegen Hauttransplantate zu unterdrücken (WOODRUFF (90), WAKSMAN u. Mitarb. (87)).

Eine Langzeitanwendung erschien wegen der Toxizität bzw. wegen des Nachlassens der lymphopenischen Wirkung nicht möglich. Die anfänglichen Mißerfolge dürften vor allem auf dem Immunisierungsmaterial (z.B. Lymphknotenhomogenate statt Lymphozyten) sowie auf einer hämolytischen Wirkung (wegen fehlender oder mangelhafter Absorption mit Erythrozyten) beruhen. Erst SACKS u. Mitarb. (69) erreichten 1963 eine länger anhaltende Lymphopenie bei Versuchen mit Ratten.

Heterologe Antilymphocyterseren erwiesen sich inzwischen bei allen bisher gebräuchlichen Methoden der Immunsuppression bei Organtransplantationen beim Tierversuch als überlegen. (1,32,41,44,47,54,56,63,91).

PICHLMAYR (62,63,64) gelang es, durch Immunisierung eines Pferdes mit Hundelymphocyten aus dem ductus thoracicus ein sehr wirksames Antilymphocyterserum zu gewinnen. Mit diesem Immunserum konnte eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeit nach homologer Nierentransplantation bewirkt werden.

II. Fragestellung

Grundlage für die hier beschriebenen Untersuchungen war die Immunisierung eines Pferdes (OTTO) mit Hundelymphozyten, aus dem Ductus thoracicus gewonnen (62). Die Lymphozytenaufschwemmung war jedoch nicht rein von Erythrozyten und Serumeiweißen (in geringen Mengen), die folglich auch eine Antikörperbildung stimulieren konnten. Als weitere Untersuchungsmaterialien hatten wir eine Reihe von Hundeseren, sowohl von nierentransplantierten Hunden, als auch von Vergleichshunden, sowie Organextrakte unbehandelter Hunde (aus der experimentellen Abteilung der Chirurgischen Universitätsklinik, München).

Unsere Untersuchungen hatten folgende Zielsetzung:

1. Kontrolle der Immunglobuline beim Pferd im Verlauf der Immunisierung mit Hundelymphozyten.
2. Prüfung, ob dieses "Pferde-Anti-Hundelymphozyten-Serum" (PAHLS) nur Antikörper gegen Hundelymphozyten enthält oder auch verschiedene Antikörper gegen Serumkomponenten bzw. Gewebsantigene vom Hund besitzt, und wenn mehrere Antikörper vorhanden sind, zu eruieren, ob (ein) spezifische (r), nur gegen Lymphozytenantigene gerichtete(r), präzipitierende(r) Antikörper vorhanden sind (ist). Diese Frage schien umso wichtiger, da erste Anwendungsversuche bei Menschen geplant waren und zudem eine Kreuzreaktion zwischen kernhaltigen Zellen untereinander bekannt war. CHRISTIAN u. LEEN (12) konnten schon 1905 leukozytotoxische Wirkungen hervorrufen, nachdem sie Kaninchen mit Rattenniere, -leber und -herzmuskel immunisiert hatten. In diesem Zusammenhang sei auch erwähnt, daß De La PAVA (14) nach Applikation eines Antitumorserums die Entstehung einer Nephritis beobachtete).
3. Untersuchungen über die Fähigkeit zur Antikörperbildung des mit Antihundelymphozytenserum behandelten Hundes.
Zu diesem Zwecke wurde die Antikörperbildung des Hundes gegen das injizierte PAHLS überprüft, ebenso das quantitative und qualitative Verhalten der Immunglobuline des Hundes während der Behandlung mit PAHLS.

III. METHODIK

Zur Beantwortung der angeführten Fragen wurden folgende physikalische, chemische, immunochemische sowie physikochemische Methoden verwandt:

1. Gesamteiweißbestimmung
2. Elektrophorese
3. Immunelektrophorese
4. Modifizierte Immunelektrophorese nach OSSERMAN
5. Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY (a) FEINBERG (b)
6. Sedimentationsanalytische Untersuchungen mittels Ultrazentrifuge
7. Herstellung von Kaninchenantisera
8. Absorption des Immunsersums mit Organextrakten

Erläuterung der einzelnen Methoden:

1. Gesamteiweißbestimmungen wurden mit der Biuretmethode nach WEICHSELBAUM (88) durchgeführt.
2. Die Papierelektrophorese wurde in dem Standardverfahren nach GRASSMANN u. HANNIG (30) angewandt. Als Puffer diente Veronal-Natrium-Azetatpuffer nach MICHAELIS (52), pH 8,6, Ionenstärke $\mu = 0,1$. Getrennt wurde auf WHATMAN - Nr. 1 - Papier. Die effektive Trennlänge betrug 13 cm. Aufgetragen wurden 0,007 ml Serum. Die Trennzeit betrug 14 Stunden bei einer Spannung von 120 Volt. Die Streifen wurden in einer gesättigten Amidoschwarzlösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit einer Mischung von Eisessig-Methanol im Verhältnis 1 : 10.
3. Für die Immunelektrophorese wurde die Methode nach GRABAR und WILLIAMS (29) in der Mikro-Modifikation von SCHEIDEGGER (70) verwendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Kombination von Elektrophorese im Agar-Gel und einer Immunpräzipitation zwischen einzelnen aufgetretenen Proteinbanden mit den spezifischen Antikörpern.

Herstellung des Stamppuffers:

58,84 g Natrium-diaethylbarbiturat und 38,84 g Natrium-acetat wurden mit aqua dest. auf 4400 ml aufgefüllt und anschließend mit etwa 700 ml 0,1/n HCl auf pH 8,2 eingestellt.

Herstellung des Agars:

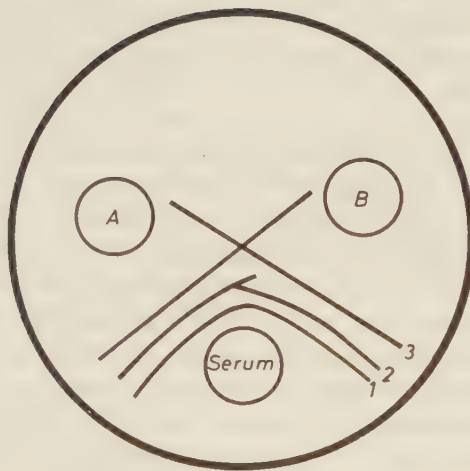
Zu einer Mischung von 1 Teil Stamppuffer und 2 Teilen aqua dest. wurde Reinagar (Behringwerke) 2 %ig gegeben und nach 5-stündigem Quellen im Dampftopf etwa 45 Minuten gelöst. Zur Entfernung der feinen Staubpartikel wurde der heiße Agar anschließend zentrifugiert. Als Konservierungsmittel gaben wir Cialit^R hinzu und bewahrten den Agar bei 4°C auf. Die Agarmenge pro Objektträger betrug 2,2 ml.

Gebrauchspuffer für die Kammersfüllung:

2 Teile Stamppuffer + 1 Teil aqua dest.

Ein Stanzapparat bot die Gewähr, daß Antikörperrillen und Antigenlöcher genormt waren (Länge der Rille 62 mm, Entfernung der Löcher 25 mm vom Rillenrand, Durchmesser 1,3 mm). Die zu untersuchende Proteinlösung (Antigen) wurde mit einer fein ausgezogenen Mikropipette in die Antigenlöcher eingefüllt (0,001 ml). Die leitende Verbindung der beschickten Agarplättchen mit dem Puffer wurde durch WHATMAN - Nr. 1 - Papier hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung war nach 90 bis 110 Minuten bei einer Stromstärke von 45 mA/sec. und einer Spannung von 280 Volt beendet. Darauf wurde der Agar in der Antikörperrille ausgehoben und etwa 0,06 bis 0,08 ml Antiserum eingefüllt. In einer feuchten Kammer bildeten sich die Immunpräzipitationen normalerweise in 12 bis 16 Stunden optimal aus. Die nicht präzipitierten Proteine wurden danach in physiologischer Kochsalzlösung während 1 bis 2 Tagen herausgewaschen.

Gefärbt wurde mit Azokarmin-Lösung (2 g Azokarmin G (Fluka), 50 ml Eisessig, 450 ml Methanol). Zum Entfärben diente 10 %ige Essigsäure.



Schema des Ouchterlony Doppeldiffusions-Test

1. Antigen A ist mit Antigen B identisch,
- 2 Partielle Antigengemeinschaft zwischen Antigen A u. B
3. Völlige Verschiedenheit der beiden Antigene

Abbildung 1 : Schematische Darstellung
der Reaktionsformen im
OUCHTERLONY-Doppeldiffusions-Test

Bei der Immunelektrophorese verwendeten wir folgende Immunsereen:

1. Antipferdeserum (Behringwerke) - Trockenserum
 2. Antipferdeserum (Hyland)
 3. Antihundeserum (Behringwerke) - Trockenserum
 4. Spezifische Antiseren aus eigener Produktion
4. Bei der nach OSSERMAN modifizierten Immunelektrophorese wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung des zu untersuchenden Serums zwei Rillen parallel zur Wanderungsrichtung ausgehoben, jeweils ober- und unterhalb des Antigenreservoirs. In die obere Rille wurde nach der elektrophoretischen Trennung Antiserum, in die untere die zu untersuchende Fraktion gefüllt. Die Diffusionszeit lag bei 24 bis 48 Stunden. Dabei bildete sich eine lange Präzipitationslinie zwischen Antiserum und Diffusionsfront der zu untersuchenden Fraktion. An der Reaktionsstelle des Antiserums mit der Komponente des Serums, die dieser Fraktion entspricht, fand sich in der langen Präzipitationslinie eine charakteristische Ausbuchtung. Nach OSSERMAN ist dies ein Beweis für die Identität der Serumkomponente mit der unten eingefüllten Fraktion. Bestand keine Gleichheit, lief die Präzipitationslinie ununterbrochen gerade durch.
5. a) Prinzip der zweidimensionalen Agardiffusionsmethode nach OUCHTERLONY (58, 59)
- Auf einer Agarplatte werden in bestimmter Anordnung verschiedene Antigenlöcher und ein Antikörperreservoir ausgestanzt und gefüllt. Nach einer entsprechenden Diffusionszeit bilden sich isolierte Präzipitationslinien dort, wo ein Antigen mit dem ihm entsprechenden Antikörper zusammentrifft. Diese Präzipitationslinien hängen ab von der Diffusionsgeschwindigkeit und Konzentration der jeweiligen Substanzen, sowie von

ihrer Entfernung voneinander. Die Diffusionsgeschwindigkeit wird maßgeblich von der Molekülgröße und -form bestimmt. Eine weitere Rolle spielt die Agarkonzentration.

Voraussetzungen zu den folgenden Theorien ist die Ausgewogenheit des Systems während der Diffusion (Konzentration, Entfernung).

1. Sind die Antigene zweier benachbarter Löcher miteinander identisch, gehen die gebildeten Präzipitationslinien ohne Spornbildung ineinander über.
2. Besitzen sie jedoch nur teilidentische Antigen-determinanten (ohne völlig miteinander identisch zu sein), gehen die beiden gebildeten Präzipitationslinien nur unter Bildung einer sogenannten "einfachen" Spornbildung ineinander über. Der Übergang ist gegabelt.
3. Bei völliger Verschiedenheit der Antigene werden sich die beiden Präzipitationslinien kreuzen. Ausnahmen bilden nach FEINBERG (19) lediglich "unbalanced systems".
4. Ein weiterer Reaktionstyp sei noch erwähnt, er ähnelt dem Typ 2. Hier stoßen zwei Linien aufeinander, wobei eine "Inhibition" besteht, jedoch keine Änderung der Verlaufsrichtung. Hier scheint ein Präzipitat eine Barriere für das andere zu sein. Die Reaktionstypen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Wesentliche Unterscheidungsmerkmale des "balanced" und "unbalanced system" sind vor allem "wandernde" Präzipitationslinien im nicht ausgeglichenen System. Im ausgewogenen Diffusionssystem hingegen treten stabile Präzipitationslinien auf.

Durchführung der Methode:

Empfohlen werden Agarkonzentrationen zwischen 0,3 bis 1,5 %. Nach ALLISON u. HUMPHREY (2 a) zeigen normale immunologische Reaktionspartner bei diesen Agarkonzentrationen keine Unterschiede gegenüber freier Diffusion. Pufferzusammensetzungen werden verschieden angegeben (Phosphat-, Borat-, Veronalpuffer), einheitlich sind die aufgeführten H^+ - Ionenkonzentrationen um pH 7,4. Die meisten Autoren schlagen zudem eine Elektrolytkonzentration um 0,85 % NaCl vor, sowie Beimengungen von Antibiotika, um das Wuchern von Mikroorganismen zu vermeiden.

Agarherstellung:

Wir untersuchten verschiedene Agarkonzentrationen und stellten keinen Unterschied bezüglich der Präzipitationsbanden fest. Auch die Elektrolytkonzentration schien in unseren Versuchsanordnungen keinen Einfluß auf die Präzipitation zu haben. Geringer konzentrierte Agarlösungen ermöglichten zwar eine geringfügige Akzeleration der Präzipitationsbildung, erschwerten dafür den Vorgang des Aushebens der Stanzzylinder erheblich. Wir arbeiteten daher im wesentlichen mit folgender Agarlösung (2%): 15 g Difco-Bacto-Agar in 1000 ml physiologischer Kochsalzlösung ließen wir 5 Stunden quellen und lösten ihn im Dampfbad, bis die Flüssigkeit klar und homogen war. Nach dem Abkühlen auf 52° C gaben wir Cialit^R hinzu und bewahrten ihn bei 4° C auf.

Wir benutzten Glasplatten (8,5 x 10 cm, die mit 12 ml Agar beschickt wurden und Objektträger, auf die wir 2,2 ml Agar gossen. Die Glasplatten waren vorher gereinigt und entfettet worden. Nach Erkalten des Agars in der feuchten Kammer stanzen wir mit Korkbohrern Löcher in der jeweils erforderlichen Versuchsanordnung. Wir benutzten deshalb Korkbohrer, da die Stanzmuster häufig modifiziert werden mußten. Ausgehoben wurden die Stanzzylinder mit umgebogenen Kanülen.

Dabei galt es, darauf zu achten, nicht den Gel um das Loch herum anzuheben, da sonst Serum unter dem Agar hätte wegfließen können, was zu unspezifischen Präzipitationen geführt hätte. Um dies zu verhindern, füllten wir versuchsweise nach dem Ausstanzen den Boden des Loches mit einer 0,9 %igen Agarlösung aus. Bessere Präzipitationsergebnisse gegenüber saubergestanzten Platten waren nicht feststellbar.

In die Reservoirs wurde in der Regel innen das Antiserum und außen herum die Antigenlösung eingefüllt. Da die Gelschicht immer gleich dick war, wurden in gleichgroße Löcher auch gleiche Mengen Serums eingefüllt (je nach Lochgröße 0,001 bis 0,2 ml). Die Diffusion fand wie üblich in einer feuchten Kammer statt und dauerte zwischen 10 und 70 Stunden bis zur optimalen Präzipitationsdarstellung. Nach der Diffusion wurde das nicht präzipitierte Eiweiß in üblicher Weise mit physiologischer Kochsalzlösung entfernt. Nach dem Trocknen färbten wir mit Azokarminlösung, wie wir sie bei der Immunelektrophorese benutzten, oder mit einer gesättigten Amidoschwarzlösung, wie wir sie bei der Elektrophoresefärbung anwandten. Entfärbt wurde wieder mit 10 %iger Essigsäure.

b) Zusätzlich führten wir den Doppeldiffusionstest auch nach der Methode von FEINBERG (19) durch.

Aus der Erkenntnis heraus, daß die Intensität der gebildeten Präzipitationslinien im Doppeldiffusionstest nicht nur von der Konzentration der in der Antigenlösung vorhandenen Proteine, sondern auch von der Entfernung der Antikörper- und Antigen-Reservoirs voneinander abhängt, entwickelte FEINBERG zur semiquantitativen Bestimmung von Proteinen eine Methode, bei der nicht wie im Rosettentest nach OUCHTERLONY Verdünnungsreihen um ein zentrales Antikörperreservoir angelegt werden, sondern Antigenlöcher

e x z e n t r i s c h um ein Antikörperreservoir gestanzt werden in einer Weise, daß eine Spiegelbildsymmetrie entsteht. In dieser Anordnung können die Konzentrationen zweier Lösungen in verschiedenen Antigen-Antiserum-Entfernungen miteinander verglichen werden. Die semiquantitative Bestimmung wird erreicht, indem die Ausbildung der Präzipitationslinien bei zunehmender Entfernung des Antigenloches zum Antikörperreservoir mit denen der Gegenseite verglichen werden. In unseren Versuchsanordnungen wurden jeweils auf der linken Seite Seren der Hunde v o r Beginn der Behandlung mit PAHLS eingefüllt; rechts wurden Seren aus dem Behandlungs v e r l a u f eingefüllt. Gegebenenfalls wurden beide Proben 1:10 verdünnt.

6. Die sedimentationsanalytischen Untersuchungen wurden mittels einer analytischen Ultrazentrifuge (Spinco Modell E) bei 59 780 U/min. durchgeführt. Die Eiweißkonzentration der von uns untersuchten Proteinlösungen betrug 1 %. Der Sedimentationskoeffizient bezieht sich auf S_{20} . Der Phasenwinkel lag zwischen 60° und 80° . Die erste fotografische Aufnahme wurde unter Beobachtung der Sedimentation von Hand geschossen. Die weiteren Aufnahmen wurden automatisch ausgelöst.
7. Zur Herstellung von spezifischen Antiseren wurden Kaninchen mit Hundevollserum und isoliertem γ -Globulin aus Hundeserum sowie mit isoliertem γ -Globulin aus Pferdeserum nach folgendem Schema immunisiert:
Im Abstand von 3 Tagen wurden fünfmal je 5 mg Eiweiß in 0,5 ml physiol. Kochsalzlösung intravenös injiziert. Nach einer Unterbrechung von 10 Tagen wurden 5 mg intraperitoneal gespritzt. Nach weiteren 3 Tagen erfolgten erneut 3 i.v.-Injektionen von je 5 mg wieder in Abständen von 3 Tagen. 6 Wochen nach Beginn der Immunisierung wurden die Kaninchenserum auf ihre Aktivität geprüft und im positiven Fall wurde das Kaninchen entblutet. Die Isolierung

des γ -Globulins erfolgte auf DEAE-Cellulose und Sephadex. Die Methodik ist bei FATEH-MOCHADAM et al. (17) beschrieben.

8. Zur Absorption des PAHLS wurde natives Immunserum schrittweise mit dem jeweiligen Organextrakt versetzt und anschließend bei 1000 U/min. zentrifugiert, bis die Kontrolle im Doppeldiffusionstest negativ blieb; d.h. gegenüber dem entsprechenden Organ keine Präzipitationslinie mehr nachweisbar war. In gleicher Weise geschah die Absorption mit Serum und Lymphe. Die Organextrakte -hergestellt nach SACKS (69) - wurden uns aus der Abteilung für experimentelle Chirurgie (Leitung: Prof. Dr. W. BRENDEL) der Chirurgischen Klinik der Universität München (Direktor: Prof. Dr. R. ZENKER) überlassen.

IV. E r g e b n i s s e

1. Veränderungen der Pferde - γ - Globuline während der Immunisierung mit Hundelymphozyten.

a) Elektrophoretische Befunde:

Im Verlauf der Immunisierung führten wir serienmäßig Papierelektrophoresen durch. Dabei fanden wir, daß die γ - Globuline global, abgesehen von geringfügigen Schwankungen, zugenommen haben. Lediglich die γ - Globulinkonzentration der Probe vom 10.1.66 zeigte eine deutliche Abnahme, die sicherlich außerhalb der normalen Schwankungsbreite liegt. Dieser Befund entspricht auch den unten noch zu besprechenden durch Immunelektrophorese und Doppeldiffusionstechnik erhobenen Befunden. Diesbezüglich ist erwähnenswert, daß die Immunisierung des Pferdes mit Hundelymphozyten nach Beginn am 30.9.65 am 5.11.65 abgeschlossen war. Danach bekam das Pferd an folgenden Daten Booster-Injektionen : 26.11., 16.12., 12.1.66, 26.1., 15.2., 4.3., und 16.3.66. Daraus ist zu ersehen, daß vor dem 10.1. das Pferd 25 Tage keine Injektion bekommen hatte; möglicherweise eine Erklärung für die oben erwähnte Abnahme der γ - Globuline.

Es erscheint uns wichtig zu betonen, daß die Veränderungen im Bereich der γ - Globuline auch vielen anderen Faktoren außer der Immunisierung unterliegen (Gesundheitszustand). In Tabelle 1 sind die elektrophoretisch bestimmten Eiweißveränderungen im Verlauf der Immunisierung wiedergegeben.

b) Sedimentationsanalytische Untersuchungen:

Diese Untersuchungen erfolgten lediglich als Kontrolle. Besonders signifikante Änderungen ergaben sich nicht. In ihrer Einstimmung mit den obengenannten Befunden nahm auch hier die G - Komponente von 30,2% am 12.11.65 auf 26,2 % am 10.1.66 ab. Gleichzeitig stieg die M - Komponente von 6,3 auf 7,8 % leicht an.

c) Immunelektrophoretische Befunde:

Abbildung 2 zeigt die Immunelektrophorese verschiedener Serumproben des Pferdes während der Immunisierung. (Oberhalb der Antikörperrille wurde jeweils zum Vergleich eine Serumprobe des Pferdes vor Immunisierung eingefüllt. In die Antikörperrille gaben wir Antipferdeserum vom Kaninchen.)

Die γ G- Globulinpräzipitationslinie zeigt eine stetige Verstärkung der Intensität sowie eine allmähliche Verlängerung an ihrem kathodischen Ende. Außerdem wird das diffuse Überschußphänomen im gesamten Bereich des γ -Globulins, das erst am 19.10. deutlich zu sehen ist, im Verlauf der Immunisierung immer ausgeprägter. Die genannten Veränderungen (Intensitätszunahme, Verlängerung und Überschußphänomen) sind am 12.11.65 am markantesten. Später wird die γ G-Linie wieder schwächer. Die immunologisch eindeutig feststellbare Verminderung des γ G-Globulins am 10.1.66 entspricht den unter a) und b) erwähnten Befunden.

Abbildung 3 zeigt eine Immunelektrophorese, wobei die Serumproben vom 12.11.65 (oberhalb) und 10.1.66 (unterhalb der Antikörperrille) einander gegenübergestellt sind. Die Intensitätsabnahme bzw. Abschwächung der γ G-Präzipitationslinie des Serums vom 10.1.66 gegenüber der Probe vom 12.11.65 ist deutlich dargestellt.

Auch die γ A- und die γ M-Linien zeigen im Verlauf der Immunisierung auch eine Verstärkung.

Die eigentliche Erfolgskontrolle einer Immunisierung spiegelt sich im Nachweis der neugebildeten Antikörper gegen das injizierte Antigen wieder. PICHLMAYR (62) konnte 1-2 Wochen nach Immunisationsbeginn agglutinierende und cytotoxische Antikörper nachweisen. Unsere Aufgabe bestand darin, die präzipitierenden Antikörper zu erfassen. Die bisher genannten Veränderungen der Pferde - γ -Globuline waren quantitativer Art. Der Nachweis und die Unterscheidung von Antikörpern gibt entsprechende Veränderungen qualitativer Art wieder. Gleichzeitig stellt sich dabei die Frage nach der

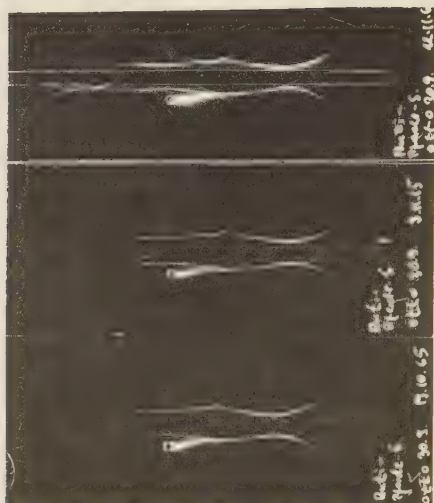


Abbildung 2: Immunelektrophoresen verschiedener Serumproben des Pferdes "Otto" im Verlauf der Immunisierung mit Hundelymphozyten. Oberhalb der Antikörperrille zum Vergleich jeweils das Serum vom 30.9. (vor dem Immunisierungsbeginn), unterhalb der Antikörperrille Serumproben vom 19., 34. und 42. Tag der Immunisierung. Als Antiserum wurde Antipferdeserum vom Kaninchen benutzt.

Abbildung 3: Immunelektrophorese zweier Pferdeseren.

Die Serumprobe vom 12.11. (42 Tage nach Immunisierungsbeginn mit Hundelymphozyten) wurde oberhalb der Antikörperrille eingefüllt, unterhalb wurde zum Vergleich das Serum vom 10.1.66 (102 Tage nach Immunisierungsbeginn) eingefüllt. Als Antiserum diente Antipferdeserum vom Kaninchen.

Spezifität der gebildeten Antikörper, was im folgenden Abschnitt untersucht werden soll. Hier sei lediglich erwähnt, daß diese präzipitierenden Antikörper 19 Tage nach Immunisierungsbeginn erstmalig im Doppeldiffusionstest nachweisbar waren. In der Folgezeit konnte dann eine Zunahme der Intensität sowie eine wachsende Zahl der Präzipitationslinien beobachtet werden, was mit den übrigen Befunden in Einklang gebracht werden kann. Die Tabelle 2 gibt die Zahl der Präzipitationslinien, die während des Immunisierungsverlaufes nachgewiesen wurden, wieder.

2. Untersuchungen über die Spezifität präzipitierender Antikörper im Pferde - Anti - Hunde - Lymphozyten - Serum (PAHLS)

a) Voruntersuchungen:

Zunächst wurden elektrophoretische und immunelektrophoretische Untersuchungen der Organextrakte (unter Verwendung von Antihundeserum vom Kaninchen) durchgeführt, um den Gehalt der einzelnen Proteinfractionen in Organextrakten zu ermitteln. Dabei ergaben sich für die einzelnen Organproben sowohl qualitativ als auch quantitativ unterschiedliche Werte und Befunde für die Eiweißfraktionen. Elektrophorese und Immunelektrophorese der Lymphe entsprachen denen des Serums.

Die Prüfung auf Spontanantikörper im Pferdeserum vor Immunisierung verlief negativ. Es fanden sich weder Antikörper gegen Hundeserum noch gegen Organextrakte.

In gleicher Weise wurden die Seren unbehandelter Hunde auf Spontanantikörper gegen Pferdeserum untersucht. Auch hier konnten keine Antikörper gegen Eiweißkomponenten im Pferdeserum nachgewiesen werden.

b) Identifizierung von Hundeantigenen, gegen welche die präzipitierenden Antikörper des PAHLS gerichtet sind:

In den immunelektrophoretischen Untersuchungen wurde das PAHLS in die Antikörperrille gefüllt. Die Antigenreservoirs

wurden mit Organextrakten bzw. Serum oder Lymphe unbehandelter Hunde beschickt. (Diese Versuchsanordnung sollte Fehlinterpretationen verhindern. In den Seren PAHLS-behandelter Hunde war nämlich das Vorhandensein präzipitierenden Antikörper gegenüber Pferdeserum nicht auszuschließen.) Wegen der geringeren Empfindlichkeit der Methode liegt die Zahl der gebildeten Präzipitationslinien unter der im Doppeldiffusionstest gebildeten Linien. Die präzipitierenden Antikörper im PAHLS sind überwiegend im γ -G-, aber auch im γ M- und γ A-Globulin lokalisiert. Folgende Präzipitationslinien stellten sich dar:

- Serum: 1 Linie im γ -Bereich, 1 Linie im γ/β - Bereich,
2 Linien im α_1/α_2 - Bereich;
Lymphe: außer den oben erwähnten Linien eine weitere, die als β - Lipoproteid identifiziert wurde;
Niere: 1 Linie im γ - Bereich, 1 Linie im α_1 - Bereich,
1 Linie im α_2 - Bereich;
Lymphocyten: 1 Linie im γ - Bereich, ein "Depotfleck" auf der kathodischen Seite des Antigenreservoirs;
Lymphknoten: 1 Linie im γ - Bereich;
Milz: 1 Linie im γ - Bereich, 1 Linie im α_1 - Bereich;
Leukocyten: 1 Linie im γ - Bereich.

Die Intensität der aufgeführten Linien differierte für die verschiedenen Organe. Dies ist auf den unterschiedlichen Gehalt der einzelnen Proteine in den Geweben zurückzuführen (37 , 71)

42 Tage nach Immunisierungsbeginn hatten sich die Präzipitationslinien bezüglich Zahl und Intensität maximal ausgebildet. Im Ouchterlony-Test ließen sich zwischen PAHLS und Hundeserum 9, Hundelymphe 10, Hundelymphknoten 7, Hundemilz 6, Hundelymphocyten 11, Hundeniere 7, Hundeleber 6, Hunderythrozyten 9 und Hundeleukozyten 2 Präzipitationslinien nachweisen. Vergleiche dazu Abb. 4a und 4b.

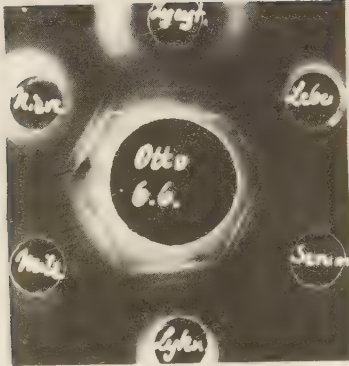


Abb. 4 a

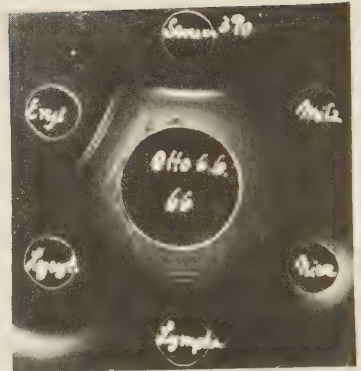


Abb. 4 b

Abbildung 4: Nachweis präzipitierender Antikörper des Pferdeantihundelymphozytenserums (PAHLS) gegen Serum, Lymph, Lymphozyten, Erythrozyten und einige Organextrakte des Hundes. Im zentralen Loch: PAHLS ("Otto" 6.6.66), in den peripheren Löchern die bezeichneten Organextrakte bzw. Proteinlösungen.

c) Synopsis von OUCHTERLONY-Testen zur Untersuchung der Identität der gebildeten Präzipitationslinien:

Mittels Ouchterlony-Technik wurden zahlreiche Untersuchungen zur Klärung der Identität, Teilidentität und Nichtidentität der gebildeten Linien durchgeführt. Die Untersuchungen wurden so angesetzt, daß jede zu untersuchende Probe mindestens einmal in unmittelbare Nachbarschaft zu jeder anderen Probe zu liegen kam. Da die optimale Diffusionsdauer der einzelnen Substrate unterschiedlich war, zum Teil auch der einzelnen Antigene innerhalb eines Organextraktes, war eine große Anzahl Untersuchungen notwendig, um die einzelnen Präzipitate fassbar zu machen. Es war nicht möglich, auf einer Diffusionsplatte für alle gleichzeitig untersuchten Gewebsextrakte die jeweils größte Anzahl von Präzipitationslinien darzustellen. Die Reaktionsform der einzelnen Präzipitationslinien der Gewebsextrakte, des Serums und der Lymphe ist in Abb. 5 synoptisch und schematisch dargestellt. Wie aus Abb. 4 und 5 zu ersehen ist, verlaufen einige ineinander übergehende (= identische) Linien in unterschiedlicher Entfernung vom Antikörperreservoir. Dieses Phänomen deutet auf unterschiedliche Konzentration gleicher Antigene in verschiedenen Organen hin. Die meisten Linien gehen ohne Spornbildung ineinander über. Zwischen PAHLS und Serum, Lymphe, Lymphozyten sowie Erythrozyten stellen sich die meisten Antigen - Antikörperkomplexe dar. Die durchgeführten Untersuchungen geben keinen sicheren Aufschluß darüber, ob im PAHLS spezifische Antikörper gegen Antigene existieren, die nur in Extrakten aus Lymphozyten bzw. lymphatischen Organen vorkommen. Die Vielzahl der gebildeten Linien im Zusammenhang mit den bekannten methodischen Schwierigkeiten erschweren eine endgültige Aussage. Kombinatorische Überlegungen erlauben jedoch folgende Feststellungen:

1. Die meisten von PAHLS präzipitierten Antigene lassen sich in allen Organen, Serum und Lymphe nachweisen, wobei sie jeweils die Reaktionsform einer vollständigen Identität zeigen.

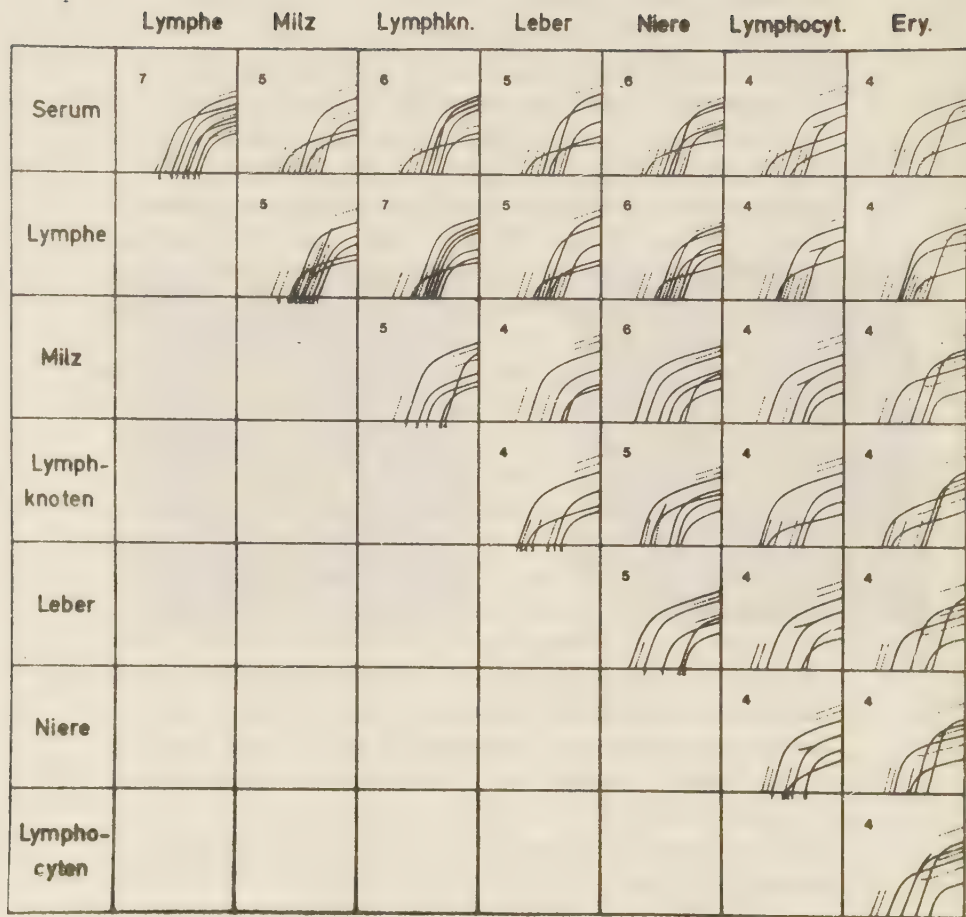


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Präzipitationslinien, die im Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY im Ansatz gegen PAHLs mit den in der waagerechten und senkrechten Kolonne bezeichneten Organextrakten erhalten wurden. Im rechten unteren Eck jedes quadratischen Ausschnittes ist jeweils das Depot des PAHLs zu denken. Die miteinander identischen Präzipitationslinien sind als durchgezogene Linien gezeichnet.

2. Zwischen PAHLS und Lymphozytenextrakt besteht eine Präzipitationslinie, die gegenüber den Präzipitationslinien der anderen Proteinlösungen das immunologische Phänomen der Teilidentität zeigt.

d) Absorptionsversuche zur Prüfung auf Organspezifität:

Zur Beantwortung der Frage nach der Organspezifität wurde das PAHLS mit verschiedenen Organen absorbiert. Die zusammengefaßten Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in Tabelle 3. Nach Absorption mit Hundeserum bildet PAHLS noch mit allen anderen Organen Präzipitationslinien. Die Zahl dieser Linien ist jedoch bedeutend geringer als die gegenüber nativem PAHLS. Das mit gewaschenen Hundeerythrozyten absorbierte PAHLS präzipitiert lediglich Lymphozyten, wobei nur eine Präzipitationslinie verbleibt. Diese Linie bleibt auch dann nachweisbar, wenn das Antilymphozytenserum mit allen Organen. Serum und Lymphe zugleich absorbiert wird.

e) Individuum-, Rassen- und Artspezifität der präzipitierenden Eigenschaften im PAHLS:

Die präzipitierenden Antikörper waren gegenüber zahlreichen Seren und Organextrakten verschiedener Hunde in nahezu gleicher Quantität und Qualität nachweisbar. Im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest konnten außerdem zwischen PAHLS und Humanserum drei, jedoch zwischen PAHLS und Schaf-, Ziegen- und Kalbserum keine Präzipitationslinien nachgewiesen werden.

Nachdem eine gewisse Antikörperspezifität in diesem heterologen Antilymphozytenserum angenommen werden konnte, sollte seine Wirkungsweise genauer betrachtet werden. PICHLMAYR (62,63) wies eine eindeutige lymphopenische Wirkung nach, vor allem jedoch eine deutliche Verlängerung der Toleranz von homologen Nierentransplantaten. Da bekannt ist, daß alle Noxen, die zu einer Schädigung des lymphatischen Gewebes führen, die Antikörperbildung hemmen, versuchten wir uns Einblick in die Fähigkeit zur Antikörperbildung des mit PAHLS behandelten Hundes zu gewinnen.

3. Beobachtung der Antikörperbildung und des Verhaltens der Immunglobuline beim Hund während der Behandlung mit Antilymphozytenserum vom Pferd:

a) Antikörper des Hundes gegen das injizierte PAHLS:

Während der Behandlung mit PAHLS wurden Seren von 7 Hunden (He., Th., Gu., Od., und Da., sowie Sp. III und St.) laufend auf ihre Antikörperbildung gegen artfremdes Eiweiß untersucht. Bei 5 dieser Hunde (He., Th., Gu., Od. und Da.) war eine Nierentransplantation vorgenommen worden, 2 Hunde (Sp. III und St.) bekamen lediglich PAHLS. Die Dosierung des Antilymphozytenserum betrug bei Hunden mit Nierentransplantation täglich 2 x 0,5 ml/kg i.v., bei den übrigen täglich 1 x 0,5 ml/kg i.v. Als Kontrolle diente ein Hund (Sp.II), der lediglich mit normalem Pferdeserum (NPS) behandelt wurde. Vom 12. bis 14. Tag an nach täglicher Injektion von PAHLS konnten die präzipitierenden Antikörper gegen Pferdeserum im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest und in der Immunelektrophorese nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang sowohl bei transplantierten als auch bei nur mit PAHLS behandelten Hunden. Eine Ausnahme bildete Hund He., bei dem auch nach 39 Tagen keine präzipitierenden Antikörper gegen das Pferdeserum nachweisbar waren. Dieser Hund starb an einer Friedländer-Pneumonie.

Die Antikörper im Hundeserum sind hauptsächlich gegen β -Lipoprotein und α_2 -Makroglobulin sowie in geringerem Maße gegen Albumin des Pferdeserums gerichtet. Ein gegen γ -Globulin des Pferdeserums gerichteter Antikörper konnte im Serum der mit PAHLS behandelten Hunde mittels Immunelektrophorese nicht nachgewiesen werden. Wie oben angegeben, fanden wir keine spontanen präzipitierenden Antikörper der Hunde gegen Pferdeserumproteine. Bei den Hunden Gu., Sp.III, Da., Od. und St., bei denen die Antikörperbildung über längere Zeit verfolgt werden konnte, zeigte es sich, daß die Antikörper gegen Pferdeserumproteine (bei täglicher Behandlung mit PAHLS) bis zur 4. Woche zunehmen. Von diesem Zeitpunkt an nehmen sie allmählich wieder ab, was bei den Hunden Gu. und Sp. III. genauer beschrieben werden soll. Hingegen war beim Kontrollhund, der mit NPS

behandelt worden war, weiterhin eine Zunahme festzustellen.

Der Hund Gu., dem eine homologe Niere implantiert worden war, erhielt 6 Monate lang 2 x täglich 0,5 ml PAHLS/kg Körpergewicht i.v. injiziert. Nach dieser Zeit wurde die Behandlung abgesetzt. Der Hund zeigte während des Untersuchungszeitraumes von 2 Jahren nach der Transplantation keine Abstoßungsreaktion. Die präzipitierenden Antikörper dieses Hundes gegen Pferdeserum waren im Doppeldiffusionstest bis zu folgenden Verdünnungen nachweisbar:

Nach 2 Wochen bis zu 1 : 1

Nach 4 Wochen bis zu 1 : 128

Nach 8 Wochen bis zu 1 : 32

Nach 10 Wochen bis zu 1 : 4

Ab der 16. Woche nach Behandlungsbeginn konnten weder in der Immuoelektrophorese noch im Ouchterlony-Test Antikörper nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der Antikörperbildung verhielt sich der Hund Sp. III - ohne Nierentransplantation - entsprechend. Er war ebenso wie Hund Gu. mit PAHLS behandelt worden. Auch bei ihm kam es nach anfänglicher Antikörperbildung unter fortlaufender Serumgabe zu einer Abnahme der Antikörpertiterhöhe. 6 Monate nach Behandlungsbeginn konnte der Antikörper nur noch äußerst schwach nachgewiesen werden. Erwähnenswert ist, daß 12 Tage nach Wiederaufnahme der Injektionen im Anschluß an eine 4-wöchige Behandlungspause erneut Antikörper gegen Pferdeserum nachweisbar wurden und zwar in stärkerem Maße als im gleichen Zeitraum nach Beginn der ersten Behandlungsserie.

b) Verhalten der Immunglobuline des Hundeserums während der Behandlung mit PAHLS:

Die Seren der erwähnten Hunde wurden während der Behandlung mit PAHLS papierelektrophoretisch, immuoelektrophoretisch, sedimentationsanalytisch, mittels Ouchterlony-Rosettentest und mit der semiquantitativen exzentrischen Doppeldiffusionsmethode nach FEINBERG untersucht. In Tabelle 4 sind außer dem Gesamteiweißgehalt Relativ- und Absolutwerte der elektrophoretisch bestimmten Proteinfractionen angegeben. In Tabelle 5 ist die prozentuale Abweichung oben genannter Werte bei einem

der homotransplantierten und mit PAHLS behandelten Hunde (Hund Gu.) aufgeführt. Die Werte des Tages 0 vor Behandlungsbeginn wurden als Ausgangswert 100 % angegeben. Aus den Zahlen ist zu entnehmen, daß die γ -Globuline anfänglich global zunehmen, nach 27 Tagen einen Höchstwert erreichen und sodann wieder abnehmen bzw. sich normalisieren. Eine signifikante Abnahme unter den Ausgangswert wurde während der gesamten Behandlungsdauer nicht gefunden. Eine grafische Darstellung (Abb. 6a und b) verdeutlicht das oben Gesagte. Die absoluten und relativen Werte der γ -Globuline und deren prozentuale Abweichung vom Ausgangswert wurden hier schematisch zusammen mit den Werten für Albumin und Gesamteiweiß dargestellt. Ein entsprechendes Verhalten wurde auch bei den übrigen Tieren mit längerer Versuchsdauer (bei Behandlung mit PAHLS) festgestellt.

Eine signifikante Veränderung der A- (Albumine und langsam sedimentierende Globuline), G- (γ -Globuline und schnell sedimentierende Globuline) und M- (Makroglobuline) Komponenten der Hundeseren konnte bei der sedimentationsanalytischen Untersuchung vor Behandlung mit PAHLS und 191 Tage nach Behandlungsbeginn nicht gefunden werden.

In der Immunelektrophorese zeigt die γ G-Globulin-Präzipitationslinie nach 27-tägiger Behandlung gegenüber dem Ausgangsserum eine Intensitätsverstärkung, kathodische Verlängerung und ein diffuses Überschußphänomen. Diese Veränderungen zeigen eine Vermehrung der γ G-Globuline an. Die γ G-Globulinlinie ist 59 Tage nach Behandlungsbeginn im Vergleich mit der Serumabnahme nach 27-tägiger Behandlung schwächer und kürzer dargestellt. 111 bzw. 115 Tage nach der erstmaligen Applikation des PAHLS zeigt die γ G-Globulinlinie die gleiche Intensität und Länge wie das Ausgangsserum. An den γ A- und γ M-Globulinpräzipitationslinien traten keine signifikanten Veränderungen auf. Auch nach 191 Tagen - am Ende der Behandlung - konnten im Bereich der Immunglobulinpräzipitationslinien keine nennenswerten quantitativen Veränderungen gefunden werden. Der Beweis, daß die γ G-Globuline im gesamten Behandlungszeitraum keine wesentliche Abnahme zeigen, konnte einwandfrei durch die

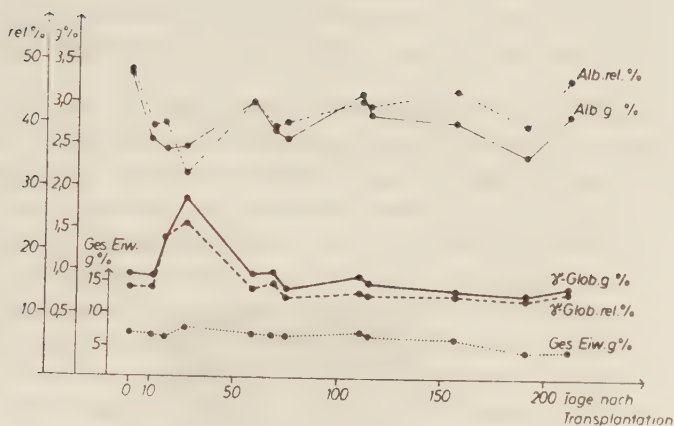


Abb. 6a: Elektrophoretisch bestimmte γ -Globulin- und Albumin-Konzentration eines Hundeserums während der Behandlung mit PAHLS. (Tage nach Transplantation = Tage der Behandlung)

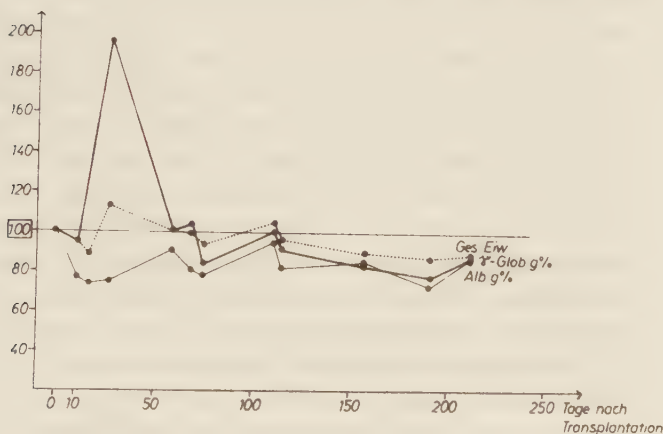


Abb. 6b: Veränderungen der γ -Globuline, Albumine und des Gesamteiweiß des Hundes im Verlauf der postoperativen Applikation von PAHLS. Ausgangswert ist das Serum des Hundes vor der Operation = 100 %. (Tage nach der Transplantation = Tage der Behandlung)

semiquantitative Bestimmung der μ G - Globuline mit der exzentrischen Diffusionsmethode nach FEINBERG sowie mit dem Rosettentest nach OUCHTERLONY erbracht werden (vgl. Abb. 7).

c) Während unserer Untersuchungen stießen wir auf die Frage nach dem Verbleib des Pferdeimmunserums nach seiner Injektion. Das Antipferdeserum vom Kaninchen besitzt präzipitierende Antikörper gegen Normalhundeserum bzw. Hundeserum vor Behandlung mit PAHLS, die auf Antigengemeinschaft bzw. Kreuzreaktion zwischen Hund und Pferd beruhen. Aufgrund dieser Kreuzreaktion ist eine Beurteilung über den zeitlichen Verbleib des PAHLS überaus schwierig, sofern man sich nicht markierter Substanzen bedient. Die uns zur Verfügung stehenden Methoden erlaubten uns jedoch folgende Aussagen: Mittels Doppeldiffusionstestes konnte nachgewiesen werden, daß die vorhandenen Präzipitationslinien zwischen Antipferdeserum (APS) und Hundeserum 12 Stunden nach der Behandlung der Hunde mit PAHLS eindeutig zunehmen und daß zusätzliche Präzipitationslinien auftreten. Diese waren auch noch 3 Wochen nach dem Absetzen von PAHLS, jedoch in viel schwächerer Intensität vorhanden. Hier sei erwähnt, daß TSIRIMBAS (84) 27 bis 175 Tage nach dem Absetzen eines Antihumanlymphocytenserums vom Pferd "Pferdeserumantigene" im Patientenblut nachweisen konnte. Ob hier eine Fehlbeurteilung infolge methodischer Schwierigkeiten vorliegt, soll hier nicht erörtert werden. Zur Identifizierung der erwähnten Präzipitationslinien im OUCHTERLONY-Test wurde die modifizierte Immunelektrophorese nach OSSERMAN durchgeführt: Die mit Antipferdeserum reagierenden Komponenten im Hundeserum sind hauptsächlich mit folgenden Komponenten des Pferdeserums identisch bzw. antigenetisch verwandt: Albumin, α_1 -Glykoproteid, α_2 -Makroglobulin, β -Lipoproteid, Transferrin und μ G-Globulin.

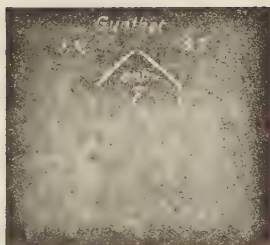


Abbildung 7: Semiquantitative Bestimmung der γ - Globuline des Hundeserums Gu. mittels des Doppel-
diffusionstestes nach FEINBERG. Antiserum:
Antihunde- γ -Globulinserum vom Kaninchen
im zentralen Reservoir. Gu.-Hundeserum vor
Behandlung in den Antigenreservoir der
linken Bildhälfte, Gu.-Hundeserum 191 Tage
nach Behandlung mit PAHLS in den Antigen-
reservoir der rechten Bildhälfte.

V. Diskussion

1. In unseren Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß im Verlauf der Immunisierung des Pferdes mit Hundelymphozyten die γ -Globuline zunahmen.

Die Zunahme der γ -Globuline beruht zumindest zum Teil auf der Antikörperbildung gegen die zugeführten Fremdproteine (hier Hundelymphozyten). Es bestand eine Korrelation zwischen der γ -Globulin-Zunahme und der Bildung von präzipitierenden Antikörpern gegen das injizierte Fremdprotein. So ging der Abfall der γ -Globuline um den 10.1.66 mit einer deutlichen Intensitätsabschwächung der Präzipitationslinien einher. Es kann hingegen keine Aussage erbracht werden, ob alle im Verlauf der Immunisierung neugebildeten γ -Globuline spezifische Antikörper gegen Hundeproteine sind.

Der Anstieg der γ -Globuline im Verlauf einer erfolgreichen Immunisierung braucht nur wenig oberhalb der physiologischen Grenze zu liegen. STÖCKL (81) führte im Verlauf von Rotlaufimmunisierungen Untersuchungen über das Verhalten der Eiweißkörper im Pferdeserum durch. Er beobachtete eine mehr oder minder signifikante Vermehrung der γ -Globuline, kam jedoch zu dem Ergebnis, daß aus den elektrophoretischen Untersuchungen kein Rückschluß auf den Schutzwert (Antikörpertiter) des Serums möglich war. Über die Korrelation der γ -Globulinmenge und Aussagemöglichkeiten über die lymphopenische Wirkung wird unten berichtet.

2. Das durch Immunisierung eines Pferdes mit Hundelymphozyten gewonnene heterologe Antilymphozytenserum besitzt nicht nur eine Antikörperwirkung gegen Lymphozyten, sondern auch gegen Erythrozyten, Leukozyten, sowie gegen andere Gewebsextrakte und Serumproteine des Hundes.

Es wurden agglutinierende, cytotoxische und präzipitierende Antikörper festgestellt. Ob die Antikörperwirkung gegen Serumproteine, Organzellen bzw. -extrakte durch Verunreinigung der zur Immunisierung benutzten Lymphozyten

oder durch Antigenverwandtschaft zwischen Lymphozyten und anderen Organzellen bedingt ist, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden. Beide Faktoren dürften jedoch eine Rolle spielen, da

1. eine Isolierung völlig reiner Lymphozyten mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden noch nicht möglich ist und
2. die Antigengemeinschaft zwischen Lymphozyten und anderen Zellen als gesichert gelten kann.

Die Ergebnisse der beschriebenen Untersuchungen stützen sich auf die oben erwähnten Annahmen:

Das mit Hundeserum voll absorbierte PAHLS enthält präzipitierende Antikörper gegen alle Organextrakte (außer Milz), jedoch zahlenmäßig in geringerem Maße, als vor der Absorption. Der Lymphagglutinationstiter blieb dabei nahezu unverändert. Auch andere Untersucher (32 , 56 , 40) beobachteten keinen Verlust des Lymphagglutinationstiters nach Absorption des Antilymphozytenserums mit dem Serum der Spenderspezies.

Ebenfalls war es nicht möglich, mit Organextrakten alle gegen Serumproteine gerichteten Antikörper zu entfernen.

LAWSON (45) konnte zeigen, daß Kaninchen-Antihundelymphozytenserum präzipitierende Antikörper gegen Serum und Organextrakte des Hundes enthält. Dies führte er auf eine Verunreinigung des Immunisierungsmaterials (Lymphozyten) mit Lymphe zurück. Um seine Annahme zu bestätigen, immunisierte er ein Kaninchen mit zellfreier Lymphe und gewann damit ein Antilymphserum. Dieses besaß präzipitierende Antikörper gegen alle untersuchten Organe und Serum mit Ausnahme von Pankreas und Lymphozyten. Die auf den OUCHTERLONY-Platten gebildeten Präzipitationslinien zwischen Antilymphserum und Hundeserum sowie zwischen Antilymphozytenserum und Hundeserum zeigten das immunologische Phänomen der Identität. IWASAKI (40) fand eine Verminderung des Lymphagglutinationstiters durch

Absorption mit Leber- oder Nierenzellen, nicht jedoch mit Serum. Hier sei auch auf Beobachtungen von CHRISTIAN u. LEEN(12) hingewiesen, die durch eine Immunisierung mit Niere, Leber und Herzmuskel Leukozytotoxine gewinnen konnten. JEEJEEBHOY (42) beschrieb eine geringgradige immunsuppressive Wirkung des Antileberserums, ähnlich der eines Antilymphozytenserums. Schließlich behaupteten LEVEY u. MEDAWAR (46), daß auch andere Zellen als Lymphozyten zu Antiseren führen können, welche die Eigenschaften eines Antilymphozytenserums besitzen. Diese Ergebnisse könnten für gemeinsame Antigenkomponenten der Organextrakte und Lymphozyten sprechen.

Die toxische Wirkung des Antilymphozytenserums, wie sie früher beobachtet wurde (4 , 90 , 91) dürfte auch auf eine mangelnde Absorption der gegen verschiedene Organe und Zellen gerichteten Antikörper zurückzuführen sein. Hierbei spielen wahrscheinlich die antierythrocytären Antikörper eine besonders wichtige Rolle. Würde das PAHLS vor Injektion nicht mit Erythrozyten absorbiert, würde in vivo eine tödliche Hämolyse eintreten.

Das nicht absorbierte PAHLS besitzt auch präzipitierende Antikörper gegen Nierenextrakte. Bei Anwendung solcher nicht absorbierter Seren muß auch mit dem Auftreten von schweren Nierenschädigungen gerechnet werden (40,42), wie sie auch bei Anwendung von Antihuman-Cancer-Immunserum beschrieben worden sind (14).

Von besonderem Interesse ist, daß das mit ausreichenden Mengen gewaschener Erythrozyten absorbierte PAHLS in vivo gut verträglich ist, sowie bei Testung im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest keine präzipitierenden Antikörper mehr gegen Serumproteine und Organextrakte mit Ausnahme von Lymphozyten besitzt (vergl. Tab. 3). Dieses Resultat konnte weder durch Absorption mit Serum, noch mit irgend einem der erwähnten Organextrakte erzielt werden. Entsprechende Befunde konnten jedoch dann erhoben werden, wenn das

PAHLS nicht nur mit Hundeserum, sondern auch mit allen Organextrakten zugleich absorbiert wurde. Es ist somit wahrscheinlich, daß durch die Absorption des Immunserums mit genügenden Mengen von Erythrozyten nicht nur präzipitierende Antikörper gegen Serumproteine und Erythrozyten, sondern auch solche Antikörper, die gegen gemeinsame Gewebsantigene gerichtet sind, entfernt werden. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß in Erythrozytenextrakten z.B. immunelektrophoretisch mindestens 10 Antigenkomponenten von nicht-Hämoglobincharakter nachgewiesen werden konnten. Die meisten dieser Antigene waren auch in anderen Gewebs-extrakten zu finden (53 , 71)

ANTOINE u. Mitarbeiter (3) wiesen bei den meisten von ihnen getesteten Antilymphozytenseren präzipitierende Antikörper gegen verschiedene Antigene in Lymphzellhomogenaten nach. Sie unterschieden Antigene, die

- a) im Plasma vorkommen,
- b) nicht im Plasma nachgewiesen werden, aber in anderen Geweben vorhanden sind,
- c) für Lymphzellen spezifisch sind, untereinander jedoch bezüglich Qualität und Quantität differieren.

JEEJEEBHOY (42) fand in Antiseren gegen Rattenlymphknoten-zellen, Rattenserum und Rattenleber präzipitierende Anti-körper gegen Serumproteine. Aufgrund seiner immunelektro-phoretischen Analysen sagte er aus, daß die Antikörper gegen "alle größeren Bestandteile" des Rattenserums einschließlich IgG, IgM gerichtet sind. SACKS (69) u. GRAY (32) wiesen ebenfalls präzipitierende Antikörper gegen Serumproteine und verschiedene Organextrakte nach. Seine Untersuchungen führten SACKS zu dem Ergebnis, daß im lymphatischen Gewebe Komponenten enthalten sein müssen, die in anderen Geweben nicht vorkommen. Nach Absorption des Kaninchen-Antimäuselymphknoten-zellserums mit Milz oder Lymphknoten konnten GRAY und Mitarb. keine präzipitierenden Antikörper mehr gegen die übrigen Organextrakte finden. Zwischen dem mit Leber oder Niere absorbierten RAMLS und Milz bzw. Lymphknoten entstand im

Gel-Diffusionstest jedoch eine Präzipitationslinie. Daraus folgerte er, daß sein RAMLS Antikörper gegen gewebsspezifische Antigene der Lymphknoten-Lymphozyten enthält.

Die bisher mitgeteilten Ergebnisse der Doppeldiffusionsteste erlauben aufgrund der Vielzahl der Präzipitationslinien sowie der Verschiedenheit der Antigenmuster der einzelnen Untersuchungsmaterialien, weder in quantitativer noch in qualitativer Hinsicht, eindeutige Aussagen über das Vorkommen von spezifischen, präzipitierenden Antikörper gegen Lymphozyten im PAHLS. Die erwähnten Faktoren sowie methodische Schwierigkeiten (insbesondere die rein quantitativen Unterschiede bezüglich der Antigenzusammensetzung) erklären einander widersprechende und z.T. vage Aussagen in der Literatur. Die Diskussion der Befunde anderer Autoren wird weiterhin dadurch erschwert, daß jeweils unterschiedliche Versuchsbedingungen vorliegen (Art des Antiserums: Antilymphozytenserum, Antilymphknotenserum, Antilymphknotenlymphozytenserum; verschiedene Immunisierungsverfahren; verschiedene verwendete Tierspezies). Zudem wurden die genannten Befunde von den Autoren in der Regel nur als "Nebenergebnisse" aufgeführt, ohne eine eingehende Bewertung zu erfahren.

Aufgrund kombinatorischer Überlegungen über die durchgeführten Versuche darf angenommen werden, daß im PAHLS mindestens ein "spezifischer" präzipitierender Antikörper gegen Lymphozyten vorhanden ist. Daraus darf geschlossen werden, daß in den Lymphozyten mindestens ein "spezifisches" Antigen vorkommt, welches weder im Serum noch in Gewebsextrakten enthalten ist. Unsere Ergebnisse würden damit mit den Untersuchungen von GRAY (32), SACKS (69) sowie IWASAKI (40) übereinstimmen. Für eine gewisse Spezifität des PAHLS spricht auch, daß man die agglutinierenden Antikörper gegen Erythrozyten sowie die präzipitierenden Antikörper gegen Erythrozyten

und Serumeiweiß absorbieren kann, ohne daß der Lymphagglutinationstiter des Immunserums beeinträchtigt wird. Erwähnt sei noch, daß ROSS (67) durch Gel-Diffusionsteste und Absorptionsversuche zwei spezifische, präzipitierende Antikörper in einem Anti-Menschenleukozytenserum vom Kaninchen nachweisen konnte.

Die Frage nach der sicheren Beziehung zwischen den spezifischen präzipitierenden Antikörpern, dem Lymphagglutinationstiter, der lymphopenischen Wirkung und der Verlängerung der Transplantationstoleranz bleibt weiterhin offen und war nicht Gegenstand der hier vorgelegten Untersuchungen. In der Literatur finden sich jedoch folgende Hinweise: ANTOINE (3) fand keine konstante Korrelation zwischen der Immunpräzipitation und Leukagglutinationsaktivität, der lymphopenischen Wirkung und dem transplantationsverlängernden Effekt eines Anti-lymphozytenserums. Ebenso wies JEEJEEBHOY (42) auf die fehlende Übereinstimmung von lymphozytotoxischen - und agglutinierenden Antikörpern und der verlängernden Wirkung auf die Transplantationstoleranzzeit hin. Eine in vitro-Testung, die eine sichere Aussage über die Wirksamkeit eines Serums hinsichtlich des immunsuppressiven und transplantationsverlängernden Effekts zuließe, scheint bisher noch nicht zu bestehen.

Bei der Beantwortung der Frage nach gewebsspezifischen Antigenen - hier speziell spezifischen Lymphozytenantigenen - mittels präzipitierender heterologer Antiseren, muß man sich immer über die methodischen Möglichkeiten bzw. Schwierigkeiten im Klaren sein. Unserer Meinung nach ist mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden - die empfindlichste ist mit molekularen Maßstäben verglichen ein plumpes Untersuchungsverfahren - eine sichere Aussage nicht möglich.

Einige Punkte sollen nachstehend erwähnt werden: Selbst bei der empfindlichsten immunologischen Methode wird immer ein riesiges Kollektiv von Molekülen erfaßt.

Einfache Spornbildung im Doppeldiffusionstest soll eine immunologische Teilidentität zweier Antigene bedeuten; OUCHTERLONY (59) selbst bezeichnet diese Aussage als gewagt. Unausgeglichenheit (in Bezug auf Antigen- und Antikörperverhältnisse) im System, besonders beim Antikörperüberschuß können nach KORNGOLD u. VAN LEEUWEN (43) zu einer Gabelung der Präzipitationslinien führen. Das Phänomen der Kreuzung zweier Linien, das auf völlige Verschiedenheit zweier Antigene hinweisen soll, kann nach FEINBERG (19) auch in einem "unbalanced system" vorkommen. Die unbedingte Voraussetzung für die Beurteilung immunologischer Phänomene in den Doppeldiffusionstesten ist demnach ein "balanced system". Diese Forderung ist jedoch nicht immer zu erfüllen. Die Eiweißkonzentration kann nicht immer als Maßstab genommen werden, da es sich meist um G e m i s c h e von Antigenen bzw. Antikörpern in jeweils unterschiedlicher Konzentration handelt. Bei Anwendung von Pferdeserum muß berücksichtigt werden, daß die Äquivalenzzone sehr klein ist und die Präzipitationslinien sich sowohl im Antigen- als auch im Antikörperüberschuß lösen können. Die optimale Diffusionszeit muß in Vorversuchen ermittelt werden. Bei der vergleichenden Untersuchung zweier Antigenlösungen kann die optimale Diffusionszeit der beiden Gemische aufgrund der qualitativen und quantitativen Unterschiede im Antigenmuster voneinander variieren, was eine einheitliche Beurteilung erschwert. Hingewiesen sei hier auf LAWSON (45), der zwischen seinem Antilymphozytenserum und Hundeserum sowie Organextrakten "mehr" Präzipitationslinien nachweisen konnte als gegenüber Lymphozyten. Die Möglichkeit einer zu kurzen Diffusionsdauer neben den von LAWSON genannten Gründen könnte ebenfalls diskutiert werden. Aus unseren Untersuchungen geht einwandfrei hervor, daß die optimale Diffusionsdauer für Serum und Organextrakte wesentlich kürzer ist als für Lymphozyten- und Erythrozytenextrakte. So waren z.B. nach 16 Stunden gegen Serumproteine die meisten Präzipitations-

linien, gegen Lymphozyten jedoch nur 5 Linien ausgebildet; nach 70 Stunden waren hingegen zwischen PAHLS und Lymphozyten 11 Linien nachweisbar.

Zuletzt sei noch auf die Schwierigkeiten bei der Absorption von Immunseren hingewiesen. Nach HAUROWITZ (35) enthält ein Immunserum stets ein Gemisch mehr oder weniger wirksamer Antikörper. Setzt man nun ein Antigen fraktioniert zu und entfernt mit den ersten Präzipitaten die Antikörper, ergibt weiterer Antigenzusatz keine Fällung mehr, obwohl die gleiche Menge Immunserums bei Zusatz des gesamten Antigens in einer Portion beträchtlich mehr Präzipitat liefern würde. Die fehlende Ausbildung von Präzipitationslinien zwischen einem absorbierten Antiserum und dem zur Absorption verwandten Antigengemisch muß keineswegs eine "Vollabsorption" bedeuten, es sei denn, dieses Antigengemisch ist mit dem zur Immunisierung benutzten Proteingemisch identisch. Wird beispielsweise ein Immunserum, das Antikörper gegen die Antigene ABC u. D besitzt, mit einer Lösung, die die Antigene ABC in großer Menge, das Antigen D jedoch in bedeutend niedrigerer Konzentration (z.B. 1/100 der Konzentration) enthält als das zur Immunisierung benutzte Gemisch, "voll absorbiert", so reagiert dieses absorbierte Antiserum nur noch mit der Immunisierungslösung (Anti-D). Man könnte hier den falschen Schluß ziehen, daß in dem zur Immunisierung benutzten Eiweißgemisch ein Antigen-D vorhanden ist, das in der zur Absorption verwendeten Antigenlösung nicht existiert. Umgekehrt kann ein plurivalenter Antikörper auch dann absorbiert werden, wenn im Absorptionsmaterial nur eines der entsprechenden Antigene vorhanden ist.

Die erwähnten Schwierigkeiten sind zumindest mitverantwortlich für die unterschiedlichen Befunde verschiedener Autoren über organspezifische Antigene.

Unsere Untersuchungen haben den Nachweis eines " spezifischen " Lymphozytenantikörpers im heterologen Pferdeimmenserum gegen Hundelymphozyten ergeben. Die Aussage über die Spezifität kann aber nur mit Vorbehalt gemacht werden. Es ist nämlich nicht ausgeschlossen, daß dieses Antigen nur aufgrund seiner Quantität für Lymphozyten " spezifisch " ist. Damit würde angenommen, daß dieses Antigen, wenn auch nur in verschwindend geringen Mengen, an anderen Organen gefunden werden kann.

3. Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß die Antikörperbildung gegen artfremdes Serum (vom Pferd) bei den homolog transplantierten Hunden während der PAHLS - Behandlung in einer Dosierung, die eine deutliche Verlängerung der Toleranzzeit bewirkte, trotz der fehlenden Abnahme der Immunglobuline abgeschwächt ist. Ähnliche Ergebnisse erzielte man bei Immunisierungsversuchen mit Hammelerythrozyten, sofern diese nach Beginn der PAHLS - Behandlung gegeben wurden (18,34) . Zudem konnte nachgewiesen werden, daß die präzipitierenden Antikörper im Hundeserum gegen Pferdeserumproteine vom 12. bis 14. Tag nach täglichen Injektionen des PAHLS anfänglich zunehmen und später wieder abnehmen. Bei zwei Hunden, die über längere Zeit beobachtet wurden, waren 16 Wochen nach Behandlungsbeginn keine bzw. nur noch Spuren von Antikörpern nachweisbar. Eine " Immunparalyse " (d.h. ein selektiver Antikörpermangelzustand, der in der Regel ohne gleichzeitige Verminderung der γ -Globuline einhergeht und nach übermäßiger natürlich oder künstlich induzierter Antigenzufuhr auftritt - " protein overloading " - (74 , 75 , 50 , 15 ,34), konnte hier nicht vorliegen, da sonst die mit NPS behandelten Hunde den gleichen Effekt hätten zeigen müssen; bei diesen wurde jedoch eine ständige Zunahme der Antikörper festgestellt. Gegen die Annahme einer immunologischen Toleranz spricht

der beschriebene " booster "- Effekt nach der Behandlungspause und dem Wiederbeginn der PAHLS - Injektion. Daß es sich um eine echte Abschwächung der Antikörperbildung der mit PAHLS behandelten Hunde handelt, zeigt auch die eindeutige Verminderung der Antikörperbildung gegen injizierte Hammelerythrozyten, wenn diese nach Beginn der Behandlung gegeben wurden. 8 Tage nach der Antigengabe (Hammelerythrozyten) betrug der reziproke Wert des Hämagglutinationstiters bei den mit PAHLS behandelten Hunden 8, bei den mit NPS behandelten Hunden 128 (18,34). Auch MONACO (55) und GRAY (32) konnten eine Verminderung der Antikörperbildung gegen Antigene, die während der Behandlung mit Antilymphozytenserum zugeführt wurden, feststellen. Im Einklang mit der verminderten Antikörperbildung gegen das während der Behandlung zugeführte Antigen steht auch die klinische Beobachtung, daß die anaphylaktische Reaktion bei den Tieren, die unter PAHLS - Behandlung standen, schwächer ausgebildet war als bei denen, welchen NPS zugeführt wurde. Da bekannt ist, daß die Lymphozyten für den normalen Ablauf der " immune response " unerläßlich bzw. in die Antikörperbildung eingeschaltet sind, ist verständlich, daß jede das lymphatische Gewebe beeinflussende Noxe auch auf die Antikörperbildung Wirkung haben muß. Die Beeinflussung der Antikörperbildung erstreckt sich bei den untersuchten Hunden wahrscheinlich auf solche Antigene, mit denen die Tiere bis zum Behandlungsbeginn noch keinen Kontakt gehabt hatten.

Eine Verminderung der Immunglobuline (abgesehen von einigen Ausnahmen, z. B. dem "normo - γ - globulinämischen Antikörpermangelsyndrom ") ist mit dem klinischen Bild des AMS gekoppelt. Die überwiegende Zahl der humoralen Antikörper ist nach elektrophoretischen Kriterien in den γ - Globulinen lokalisiert; in der Immunelektrophorese

stellen die Immunglobuline γG , γA , γM die Hauptträger der Antikörper dar. In der Annahme, daß bei normalen Tieren die quantitative Messung der γ -Globuline eine relativ genaue Aussage über die humorale Abwehrkraft des Individuums erlaubt, bestimmten wir die γ -Globuline bei den Versuchstieren elektrophoretisch, immunoelektrophoretisch, sedimentationsanalytisch und mit semiquantitativen immunologischen Verfahren (Ouchterlony - Rosetten - Test, Diffusionstest nach FEINBERG). Wir fanden, daß die γ -Globuline weder global noch in ihrer Untergruppierung (γG -, γA -, γM -Globulin) im Verlauf der Behandlung mit PAHLS abnehmen. Auch CHIBA (11) konnte keine Verminderung der elektrophoretisch bestimmten γ -Globuline feststellen.

Bekanntlich existieren neben spezifischen γ -Globulinen, d.h. γ -Globulinen mit Antikörperfunktion auch "inerte" γ -Globuline, d.h. solche ohne Antikörperfunktion. Diese beiden Gruppen sind bisher nach ihrem chemischen und physikalischen Verhalten nicht voneinander zu trennen. Die Annahme, daß die Konstanz bzw. die Nichtabnahme der γ -Globuline bei den mit PAHLS behandelten Hunden auf einer Zunahme der "inerten" γ -Globuline bei gleichzeitiger Abnahme der antikörpertragenden γ -Globuline beruhen könnte, scheint nicht berechtigt. Bei den Versuchstieren stellte sich nämlich im Verlauf der Behandlung keine Minderung der Infektabwehr, d.h. kein klinisches Zeichen eines Antikörpermangelsyndroms ein. Es ist auch wahrscheinlich, daß die Bildung der γ -Globuline mit Antikörperfunktion bzw. der spezifischen γ -Globuline mit der Bildung der inerten bzw. unspezifischen γ -Globuline eng miteinander gekoppelt ist. Bei der induzierten Abschwächung der Antikörpersynthese mit Auftreten eines AMS - z. B. durch Cytostatika - sind auch die Immunglobuline quantitativ vermindert (5). Es ist auch bekannt, daß die Induktion zur Antikörperbildung mit einem definierten Antigen auch zur Zunahme der unspezifischen

schen γ -Globuline führen kann (86).

Die Konstanz des γ -Globulinspiegels bei den untersuchten Tieren kann auch nicht dadurch erklärt werden, daß die γ -Globuline aus der Zeit vor Behandlungsbeginn stammen, da die Beobachtungsdauer über die Halbwertszeit der γ -Globuline - 8 Tage beim Hund (73) - liegt. Die Produktion von γ -Globulinen dürfte somit unter der PAHLS - Behandlung nicht gestört sein. Die Annahme, daß die Antikörperbildung gegen bakterielle Antigene zwar abgeschwächt ist, jedoch nicht ausreichend vermindert ist, um eine faßbare γ -Globulinabnahme erkennen zu lassen bzw. ein AMS herbeizuführen, ist unwahrscheinlich.

Die Diskrepanz zwischen der verminderten Antikörperbildung der Hunde gegen Pferdeserumproteine und gegen Hammelerythrozyten bei fehlender Verminderung der Immunglobulinproduktion und fehlenden klinischen Zeichen eines AMS könnte vielmehr dadurch erklärt werden, daß bei der angewandten PAHLS - Dosierung die Antikörperbildung gegen völlig neue Antigene, nicht aber gegen die dem Versuchstier bereits bekannten Antigene (" secondary response ") abgeschwächt ist. Hierfür spricht auch, daß der Hämagglutinationstiter gegenüber Hammelerythrozyten bei den mit PAHLS behandelten Tieren im Vergleich zu NPS - behandelten Tieren nicht abgeschwächt ist, wenn die Antigenezufuhr vor und mit der PAHLS - Behandlung begonnen hat. Diese Beobachtung stimmt gut mit den Untersuchungen von Mc GREGOR und GOWANS (49,28) überein. Diese erzielten durch Drainage des Ductus thoracicus eine Minderung der Bildung frei zirkulierender Antikörper nur dann, wenn die Antigengabe mehrere Tage nach der Lymphableitung begonnen wurde (" primary response "). Die anamnestiche Reaktion blieb bei den Versuchstieren erhalten (" secondary response "). Eine Depression der " primary response " bei Erhaltenbleiben der " secondary response " unter Antilymphozytenserum konnte auch GRAY (31) zeigen.

Die unterschiedliche Reaktion der Antikörperbildung gegenüber Primärantigenen und solchen Antigenen, mit denen das Tier früher schon Kontakt hatte, konnte auch bei Behandlung mit 6-MP und alkylierenden Substanzen festgestellt werden (74,77,76,36,79,80).

Der gute Allgemeinzustand, die gute Abwehrkraft gegenüber interkurrenten Infekten und die fehlende Abnahme der Immunglobuline bei den Versuchstieren ist einer der wesentlichen Vorteile der Behandlung mit Antilymphozytenserum gegenüber der mit Antimetaboliten.

Die verminderte Antikörperbildung der transplantierten Hunde gegenüber den zugeführten Pferdeserumproteinen ist für die Wirksamkeit des PAHLS bei der Langzeitbehandlung entscheidend (62,32). Es ist hervorzuheben, daß die präzipitierenden Antikörper des Hundeserums hauptsächlich gegen β -Lipoproteide, α_2 -Makroglobulin und Albumin des Pferdeserums gerichtet sind, nicht gegen Pferde- γ -Globuline. Gerade diese besitzen jedoch den höchsten Lymphagglutinations-titer bzw. bewirken die stärkste Lymphopenie (17).

4. Nachdem die tierexperimentellen Versuche mit heterologen Antilymphozytenserum erfolgreich waren, begann man mit entsprechenden Versuchen, derartige Seren auch beim Menschen anzuwenden. Derzeit gibt es für die Verabreichung von Antilymphozytenserum beim Menschen drei Indikationsbereiche:

1. Immunsuppression bei Organtransplantation
2. Immunsuppression bei Autoimmunerkrankungen
3. Therapie von hämatologischen Erkrankungen wie Lymphadenose und Lymphogranulomatose.

Das Antilymphozytenserum bewährte sich bisher bei Herz-, Lungen-, Leber- und Nierentransplantationen (7)
Die Kombination mit anderen Immunsuppressiva ermöglicht deren Einsparung und senkte somit auch die Nebenwirkungsquote.

Erfolgversprechende Remissionen konnten bei Autoaggressionskrankheiten wie Dermatomyositis, Arteriitis temporalis, Myasthenia gravis und progredient chronischer Polyarthrititis erzielt werden (83, 65)

Als naheliegender Indikationsbereich ergab sich die Behandlung chronischer lymphatischer Leukämien (84). PFISTERER (61) versuchte die lymphopenische Wirkung des Antilymphozytenserums bei lymphatischen Leukämien näher zu ergründen. Mit ^{51}Cr - markierten Lymphozytenpopulationen verglich er das Verhalten der peripheren Gesamtlymphozyten. Er kam zu dem Schluß, die Lymphopenie im peripheren Blut sei durch die Zerstörung eines Teiles der Lymphozyten und wahrscheinlich zusätzlich durch eine Hemmung der Produktion bedingt.

Die Theorien über die immunsuppressiven Wirkungsweisen reichen z.Zt. von der Vorstellung der Erschöpfung des gesamten lymphatischen Systems durch fortlaufende Zerstörung von Lymphozyten bis zu der Auffassung, daß ALS als Antigen zur "sterile activation" der immunkompetenten Lymphozyten führt, bei der eine Zerstörung von Lymphozyten nur eine Nebenwirkung des ALS darstellen würde (56, 46, 48, 93). Unter "sterile activation" versteht man, daß langfristige Anwendung von Antilymphozytenserum eine Umformung von Lymphzellen in sogenannte Blastzellen bewirkt, womit ein Verlust ursprünglicher lymphozytärer Funktionen einhergehen könnte (93). Eine weitere Theorie zur Wirkungsweise ist die "blindfolding hypothesis", bei der man sich vorstellt, daß die Oberfläche der Lymphozyten durch Immunglobuline bedeckt würde und die Zellen auf diese Weise am Antigenkontakt gehindert würden, Das wäre zwar keine Zerstörung von Lymphozyten, aber durch Blockade von Rezeptoren wäre das Erkennen von Antigenen verhindert. Als weitere Theorie wurde eine Immobilisierung der Lymphozyten im lymphatischen Gewebe diskutiert. Schließlich sprechen verschiedene

Argumente für die Annahme, daß Antilymphozytenserum als kompetitives Antigen wirkt.

Als gesichert gilt derzeit nur, daß Antilymphozytenserum durch Antikörpereigenschaften wirken und diese am lymphatischen System angreifen. Hierbei kann es sich um eine Zerstörung oder / (und) eine funktionelle Veränderung von Lymphozyten handeln - möglicherweise werden immunkompetente zirkulierende Lymphozyten sogar "bevorzugt" eliminiert.

Für die Zukunft stellen sich zahlreiche weitere Aufgaben. Die Wichtigste ist die Verbesserung der Antilymphozytenserum im Sinne einer höheren Spezifität und eines größeren Wirkungsgrades. Ein weiterer Schritt wäre die Reindarstellung der Antikörper. Die weitere klinische Erprobung bei Organtransplantationen und Autoaggressionserkrankungen erscheint jedoch berechtigt und scheint nach den bisherigen Erfahrungen die therapeutischen Ergebnisse wesentlich zu verbessern.

VI. Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wird über den Immunisierungsverlauf eines Pferdes mit Hundelymphozyten berichtet. Das so gewonnene Pferdeantihundelymphozytenserum (PAHLS) wird sodann auf die Spezifität präzipitierender Antikörper untersucht. Zuletzt werden Untersuchungen über das Verhalten des humoralen Abwehrsystems bei PAHLS-behandelten Hunden vorgestellt. Wir fanden folgende Ergebnisse:

1. Die γ -Globuline des Pferdes nehmen im Verlauf der Immunisierung zu.
2. Das Antiserum gegen Hundelymphozyten hat nicht nur eine präzipitierende Antikörperwirkung gegen Lymphozyten, sondern auch gegen Erythrozyten und Leukozyten, sowie gegen andere Gewebsextrakte und Serumproteine des Hundes.

Das mit Hundeserum voll absorbierte PAHLS enthält noch präzipitierende Antikörper gegen alle Organextrakte außer Milz. Der Lymphagglutinationstiter blieb nach der Absorption nahezu unverändert. Es war nicht möglich, alle gegen Serumproteine gerichteten Antikörper durch Absorption mit Organextrakten zu entfernen. Ein mit ausreichender Menge gewaschener Erythrozyten absorbiertes PAHLS ist in vivo gut verträglich und zeigt im Doppeldiffusionstest keine präzipitierenden Antikörper mehr gegen Serumproteine und Organextrakte mit Ausnahme von Lymphozyten. Entsprechende Befunde konnten auch dann erhoben werden, wenn das PAHLS nicht nur mit Hundeserum, sondern auch mit allen Organextrakten, mit Ausnahme von Lymphozyten, zugleich absorbiert wurde. Kombinatorische Überlegungen über die durchgeführten Doppeldiffusionsteste

und die verschiedenen Absorptionsversuche erlauben den Schluß, daß im PAHLS mindestens ein "spezifischer" präzipitierender Antikörper gegen Lymphozyten vorhanden ist.

3. a) Die Antikörperbildung gegen zugeführte Pferdeserumproteine während der PAHLS-Behandlung ist abgeschwächt, sofern diese nach Beginn der Behandlung gegeben werden.
- b) Die Immunglobuline fallen während der Behandlung nicht signifikant ab.
- c) Klinisch entwickelten die Versuchstiere unter PAHLS-Behandlung schwächere anaphylaktische Reaktionen als mit Normalserum vom Pferd behandelte Hunde, Zeichen einer Resistenzschwäche gegen bakterielle Infektionen im Sinne eines manifesten Antikörpermangelsyndroms traten nicht auf.

Diese Ergebnisse werden im abschließenden Teil im Vergleich zu anderen Autoren diskutiert.

Immuni- sierungsdauer (Tage)	Ges. Eiweiß g%	Albumin rel.%	Albumin abs. g%	γ -Glob. rel.%	γ -Glob. abs. g%	$\frac{\text{Alb.}}{\gamma\text{-Glob.}}$ (Quotient)
0	6,9	42,5	2,93	24	1,65	1,77
19	6,62	46	3,05	24,8	1,65	1,85
28	6,50	48,7	3,15	25	1,62	1,94
34	6,64	31,8	2,11	25	1,66	1,27
42	7,0	42,5	2,97	26	1,84	1,63
90	6,95	47	3,26	24	1,67	1,96
111	7,23	52	3,76	22	1,59	2,36
134	7,2	47	3,38	23	1,66	2,04
150	7,5	48	3,60	22,7	1,70	2,12
184	6,59	36,5	2,40	26	1,71	1,37
258	6,52	37,0	2,41	28,2	1,84	1,31
Normal- werte	$7,4 \pm 0,4$	$39,4 \pm 3,0$	$2,92 \pm 0,37$	$21,3 \pm 3,5$	$1,58 \pm 0,33$	

Tabelle 1 Veränderungen im Serumeiweißbild des Pferdes während der Immunisierung mit Lymphocyten. Normalwerte nach BOGUTH (6)

Tabelle 2 Präzipitationslinien im Verlauf der Immunisierung

Tage nach Immunisierungs- beginn	Lymphhe	Serum
12	Ø	Ø
19	2	3
28	4	4
34	6	6
42	9	8
90	10	9

Tabelle 3 Absorptionsergebnisse

	Serum	Lymph	Lymph- knoten	Milz	Niere	Leber	Erythro- cyten	Lympho- cyten
PAHLS (-nativ)	9	10	7	6	7	6	9	11
PAHLS, mit Serum absorbiert	ø	1	1	ø	1	1	2	2
PAHLS, mit Lymphe absorbiert	ø	ø	2	2	1	ø	2	1
PAHLS, mit Lymphknoten absorbiert	1	1	ø	ø	ø	ø	2	2
PAHLS, mit Niere absorbiert	2	1	2	ø	ø	ø	ø	1
PAHLS, mit Leber absorbiert	1	2	ø	ø	ø	ø	1	1
PAHLS, mit Erythrocyten absorbiert	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	1
PAHLS, mit Lymphocyten absorbiert	1	1	1	1	1	1	ø	ø

Tage nach Behandlung	Ges.Eiweiß g%	Albumin rel.%	g%	α_1 -Globulin		α_2 -Globuline		β_1 -Globuline		β_2 -Globuline		γ -Globuline	
				rel.%	g%	rel.%	g%	rel.%	g%	rel.%	g%	rel.%	g%
0	6,87	48,6	3,34	4,0	0,27	10,1	0,69	10,4	0,71	12,9	0,89	14,0	0,96
11	6,47	39,6	2,56	6,9	0,45	14,5	0,94	10,7	0,69	14,3	0,92	14,0	0,91
17	6,07	40,3	2,44	5,2	0,32	10,6	0,69	8,3	0,50	13,7	0,83	21,9	1,33
27	7,73	32,0	2,48	5,0	0,39	12,0	0,93	11,1	0,86	15,4	1,19	24,4	1,89
59	6,90	43,9	3,03	2,6	0,18	18,5	1,27	8,3	0,57	12,7	0,88	14,0	0,97
69	6,77	39,7	2,68	6,9	0,41	16,5	1,12	10,0	0,68	13,0	0,88	14,8	1,00
75	6,39	40,6	2,59	5,4	0,35	19,4	1,24	9,5	0,61	12,5	0,80	12,6	0,80
111	7,14	44,0	3,14	5,6	0,40	15,4	1,10	9,1	0,65	12,4	0,89	13,5	0,96
115	6,59	43,2	2,88	7,6	0,50	13,0	0,86	9,9	0,65	13,3	0,88	13,0	0,87
157	6,11	46,0	2,81	7,0	0,43	10,0	0,61	10,8	0,66	13,2	0,81	13,0	0,79
191	5,95	40,5	2,41	8,0	0,48	13,5	0,81	13,0	0,77	12,5	0,74	12,5	0,74
212	6,07	48,0	2,91	5,0	0,31	13,0	0,79	10,0	0,61	10,2	0,62	13,8	0,84
Normal- werte	6,3 ^{+0,4}	53,5 ^{+3,3}		4,2 ^{+1,2}		9,6 ^{+2,2}		8,4 ^{+1,8}		12,3 ^{+1,9}		12,3 ^{+1,9}	

Tabelle 4
 Papierelektrophoretisch bestimmte Eiweißfraktionen
 in rel. % und g-% beim Hund Gu. unter fortlaufender
 Behandlung mit PAULIS in einer Dosierung von 2 mal
 täglich 0,5 ml/kg Körpergewicht i.v. und homologer
 Nierentransplantation am 1. Behandlungstag.

Die Normalwerte nach BOGUTH (6). Dabei wurde jedoch berücksichtigt,
 daß EBEL (16) nur 5 Globulinfractionen angibt. Da wir besonderen
 Wert auf die γ -Globulinveränderungen legten, wurde auf eine weitere
 Auftrennung der Photogramme verzichtet, da sich die Unterschiede ohnehin
 nur auf die α und β -Globuline erstrecken (16,6,22).

Tage nach Behandlung	Ges. Eiweiß g%	Albumine rel. % g%	α_1 -Globulin rel. % g%	α_2 -Globulin rel. % g%	β_1 -Globulin rel. % g%	β_2 -Globulin rel. % g%	γ -Globulin rel. % g%
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
11	94,3	81,4	76,6	173,0	166,8	143,6	136,2
17	88,4	82,9	73,1	130,0	118,4	105,0	100,0
27	112,6	65,8	74,3	125,0	144,4	118,9	134,9
59	100,5	90,3	90,3	65,0	66,7	183,2	184,0
69	98,5	81,6	80,3	150,0	152,0	163,2	162,2
73	93,1	83,4	77,5	135,0	129,6	192,1	179,8
111	104,0	90,5	94,0	140,0	148,1	152,4	159,3
115	96,0	88,8	81,2	190,0	185,1	128,7	124,8
157	89,0	94,6	84,1	173,0	159,2	99,1	88,4
191	86,6	83,3	72,2	200,0	177,8	133,8	117,4
212	88,4	98,6	87,1	125,0	114,9	128,7	114,9

Tabelle 5 Prozentuale Abweichung der elektrophoretisch bestimmten Fraktionen des Hundes Gu. unter fortlaufender Behandlung mit PAULS in einer

Dosierung von 2 mal täglich 0,5 ml/kg Körpergewicht i.v. und homologer Nierentransplantation am ersten Behandlungstag.

L i t e r a t u r h i n w e i s e :

1. ABAZA, H.M., B. NOLAN, J.G. WATT and M.F.A. WOODRUFF
Effect of antilymphocytic serum on the survival of
renal homotransplants in dogs.
Transplantation, 4 (1966) 618
2. ALEXANDRE, G.P.J., J.E. MURRAY, G.J. DAMMIN and B. NOLAN
Immunosuppressive drug therapy in canine renal and skin
homografts.
Transplantation, 1 (1963) 432
- 2a. ALLISON, A.C. and H.J. HUMPHREY
A theoretical and experimental analysis of double diffusion
precipitin reaction in gels, and its application to
characterization of antigens.
Immunology, 3 (1960) 95
3. ANTOINE, B., T. NEVEU, J. BACH et M. DARDENNE
Activité immunoprécipitante de sérums antilymphocytes.
Corrélations avec d'autres effects.
Advance in Transplantation . Proc. of the First International
Congress of the Transplantation Society, Paris, 27-30 June 1967
Munksgaard, Copenhagen S. 123
4. BESREDKA, A.
La leucotoxine et son action.
Ann. de l'Inst. Pasteur, 14 (1900) 390
5. BLÄKER, F., K. FISCHER und G. LANDBECK
Quantitative Analysen der Immunglobuline (IgA, IgM, IgG)
während zytostatischer Behandlung.
Dtsch.med.Wschr., 91 (1966) 2259
6. BOGUTH, W.
Papierelektrophoretische Untersuchungen bei Haussäugetieren.
Zentralbl. f. Veterinärmedizin, 1 (1953/54) 168
7. BRENDDEL, W. und W. LAND
Überraschende Ergebnisse durch intravenöse Therapie
mit Antilymphocytenserum bei Organtransplantationen.
Dtsch.med.Wschr., 93 (1968) 2309
8. BRENT, L., J.B. BROWN and P.B. MEDAWAR
Quantitative studies of tissue transplantation immunity.
Proc.roy.Soc. B, 156 (1962) 187
9. CHEW, W.B. and J.S. LAWRENCE
Antilymphocytic serum.
J. Immunology, 33 (1937) 271

10. CHEW, W.B., D.J. STEPHENS and J.S. LAWRENCE
Antileucocytic serum
J. Immunology, 30 (1936) 301
11. CHIBA, Ch., M. ROSENBLATT, J. YAMANAKA, P. WOLF,
E. BASSENGE and R. BING
Immunologically produced lymphopenia.
Arch. intern. Med., 115 (1965) 558
12. CHRISTIAN, H.A. and LEEN
Some further observations on leucocytotoxins.
Boston Med. and Surg. J., 152 (1902) 397
13. CRUICKSHANK, A.H.
Antilymphocytic serum.
Brit. J. exp. Path., 22 (1961) 126
14. De La PAVA, S., G. NIGOGOSYAN and J.W. PICKREN
Fatal glomerulonephritis after receiving horse-anti-
human-cancer serum.
Arch. intern. Med., 109 (1962) 391
15. DRESSER, D.W. and G. GOWLAND
Immunological paralysis induced in adult rabbits
by small amounts of a protein antigen.
Nature(Lond.) 203 (1964) 733
16. EBEL, K.-H.
Papieroelektrophoretische Untersuchungen der Bluteiweiß-
verhältnisse bei Hunden, Rindern und Kälbern.
Zentralbl. f. Veterinärmedizin, 1 (1953/54) 70
17. FATEH-MOGHADAM, A., R. PICHLMAYR, H.W. JAROSCH v. SCHWEDER
und M. KNEDEL
Isolierung immunologisch wirksamer γ -Globuline eines
Pferde-Antilymphocytenserums.
Klin. Wschr., 45 (1967) 578
18. FATEH-MOGHADAM, A., M. KNEDEL, R. PICHLMAYR und Ch. MORELL
Zur Frage der Antikörperspezifität von heterologem
Antilymphocytenserum.
Klin. Wschr., 46 (1968) 1092
FATEH-MOGHADAM, A., R. PICHLMAYR, Ch. MORELL und M. KNEDEL
Verhalten der Immunglobuline und der Antikörperbildung
während der Behandlung mit heterologem Antilymphocytenserum.
Klin. Wschr., 45 (1967) 665

19. FEINBERG, J.G.
Specific titration of biological solutions in agar gel plates.
Proc. 4th int.Congr.biol.Standard, Brüssel (1958) 194
20. FELTON, L.D.
The significance of antigen in animal tissues.
J. Immunology, 61 (1949) 107
21. FLEXNER, S.
zit. nach GRAY et al.(32.), J. Immunology, 96 (1966) 217
22. GEINITZ, W.
Über Serum-eiweiße von Tieren, die häufig als Versuchstiere oder zur Gewinnung von Heilseren dienen.
Klin.Wschr., 32 (1954) 1108
23. GOOD, R.A.
In Immunopathologie, I.Internat. Symposium, Basel/Selisberg
Benno Schwabe & Co., Basel (1959) 41
24. GOOD, R.A. and R.L. VARCO
Successful homograft of skin in a child with agammaglobulinemia.
J.Amer.med.Ass., 157 (1955) 713
25. GOOD, R.A., R.L. VARCO, J.B.AUST and S.J. ZAK
Transplantation studies in a patient with agammaglobulinemia.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 64 (1957) 882
26. GOWANS, J.L.
The role of lymphocytes in the destruction of homografts.
Brit.med.Bull., 21 (1965) 106
27. GOWANS, J.L. and D.D. MCGREGOR
The immunological activities of lymphocytes.
Progr. Allergy, 9 (1965) 1
28. GOWANS, J.L., D.D. MCGREGOR and D.M.COWEN
Initiation of immune response by small lymphocytes.
Nature (Lond.), 196 (1962) 651
29. GRABAR, P. et C.A.WILLIAMS
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.
Biochim,biophys.Acta, 10 (1953) 193

40. IWASAKI, Y., K. A. PORTER, J.K. AMEND, Th.L. MARCHIORO,
V. ZUHLKE and Th. E. STARZL
The preparation and testing of horse antidog and antihuman antilymphoid plasma or serum and its protein fractions.
Surg. Gyn.Obstet., 124 (1967) 1
41. JEEJEEBHOY, H.F.
Effects of rabbit anti-rat-lymphocyte plasma on immune response of rats thymectomised in adult life.
Lancet, 2 (1965) 106
42. JEEJEEBHOY, H.F.
Studies on the mode of action of heterologous anti-lymphocyte plasma.I. A comparison of the immunosuppressive properties of dog and rabbit anti-rat lymphocyte plasma.
Transplantation, 5 (1967) 273
43. KORNGOLD, L. and G.v.LEEUWEN
The formation of multiple zones of precipitate by one antigen: An immunological explanation.
Int. Arch. Allergy, 15 (1959) 278
44. LAWSON, R., L.R. ELLIS and C.B.HODGES
Antilymphocyte serum in prolongation of dog renal homografts.
Surg. Forum, 17 (1966) 515
45. LAWSON, R., L.R.ELLIS, D. KIRCHHEIM and C.V.HODGES
The prolongation of canine renal homograft function using antilymphocyte antiserum as an immunosuppressive agent.
Transplantation 5 (1967) 169
46. LEVEY, R.H. and I.B.MEDAWAR
Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum.
Proc.nat.Acad.Sci., 56 (1966) 1130
47. LEVEY, R.H. and P.B.MEDAWAR
Some experiments on the action of antilymphoid antisera.
Ann. N.Y. Acad.Sci., 129 (1966) 164
48. LEVNY, R.H. and P.B. MEDAWAR
Further experiments on the action of antilymphocytic antiserum.
Proc.nat.Acad.Sci., 58 (1967) 470
49. MCGREGOR, D.D. and J.L.GOWANS
The antibody response of rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct.
J.exp.Med., 117 (1963) 303

30. GRASSMANN, W. und K. HANNIG
Ein einfaches Verfahren zur Analyse der Serumproteine
und anderer Proteingemische.
Naturwissenschaften, 37 (1950) 496
31. GRAY, J. G., A.P.MONACO and P. S. RUSSEL
Heterologous mouse-anti-lymphocyte serum to prolong
skin homografts.
Surg. Forum, 15 (1964) 142
32. GRAY, J.G. , A.P. MONACO, M. L. WOOD and P.S.RUSSEL
Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice.
I. In vitro and in vivo properties.
J. Immunology, 96 (1966) 217
33. GRUNDMANN, E.
Gliederung und funktionsbedingter Formwechsel der lymphatischen Strukturen.
Folia haemat. (Frankfurt), 8 (1963) 129
34. HASEK, M.
Immuntoleranz.
In Immunochemie, S. 268, Berlin-Heidelberg-New York:
Springer (1965)
35. HAUROWITZ, F.
Antigene, Antikörper und Komplement.
In: HOPPE-SEYLER-THIERFELDER, Handbuch der physiologischen
und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Auflage, Bd.IV/1,
S. 587 Berlin-Göttingen-Heidelberg:Springer 1960
36. HEKTOEN, L. and H.J. CORPER
Effect of mustard gas on antibody formation.
J.infect. Dis. 28 (1921) 279
37. HENNING, N., H. KINZLMEIER, L.DENLING und E. MANUS
Elektrophoretische Untersuchung von Zellkörpern.
Klin. Wschr., 30 (1952) 390
38. HUBER, H., C.HUBER und H. BRAUNSTEINER
Grundlagen der Lymphozytenkultur.
Dtsch. med. Wschr., 91, (1966) 360
39. INTERBITZIN, T.
Histamine in allergic responses of the skin in
Henry Ford Hosp. Sympos. on mechanism of hypersensitivity
(J.H.SHAFFER, G.A. LOGRIPPO, M.W.CHASE, editors)p. 493
Boston: Little, Brown & Co. (1959)

50. MEDAWAR, P.B.
Immunological tolerance
Nature(London), 189 (1961) 14
51. METCHNIKOFF, E.
Etudes sur la résorption des cellules.
Ann. de l'Inst. Pasteur, 13 (1899) 47
52. MICHALIS, L.
Zit. nach HOPPE-SEYLER-TIERFELDER, Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. I/1, S.85
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953
53. MICHELI, A. et P.GRABAR
Etude immunochimique des hémolysats de globules rouges humains. IV. Les estérases carboxyliques et un protéase.
Ann.Ist. Past., 100 (1960) 569
54. MITCHELL, R.M., SHELL, A.G.R., S.F.SLAVSKY, S.F.and J.MURRAY
The effect of heterologous immune serum on canine renal homografts.
Transplantation, 4 (1966) 323
55. MONACO, A.P. M.L.WOOD, J.G.GRAY and P.S.RUSSEL
Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice.
II. Effect on the immune response.
J. Immunol. 96 (1966) 229
56. MONACO, A.P., M.L. WOOD, B.A. Van Der WERF and P.S. RUSSEL
Effects of antilymphocyte serum in mice, dogs and man.
In : Antilymphocytic serum. Ciba Foundation
Study Group, 29, 111. Churchill, London (1967)
57. OSBERMAN, E.F.
A modified technique of immunoelectrophoresis facilitating the identification of specific precipitin arcs.
J. Immunol. 84, (1960) 93
58. OUCHTERLONY, Ö.
Antigen-antibody reactions in gels.
Ark.Kemi B, 26 (1948) 1
59. OUCHTERLONY, Ö.
Diffusion in gel methods for immunological analysis II.
Progr. Allergy, 6 (1962) 30
60. PAPPENHEIMER, A.M.
Experimental studies upon lymphocytes. II. The action of immune sera upon lymphocytes and small thymus cells.
J. exp. Med. , 26 (1917) 163

61. PFISTERER, H., G. MICHLMAYR, E. MEINZEL, H. BOLLAND,
A.D. TSIRIMBAS, B. HORNUNG, W. RUPPELT und W. STICH
Lymphopenie durch Antilymphozytenserum bei chronischer
lymphatischer Leukämie.
Dtsch. med. Wschr., 93 (1968) 2159
62. PICHLMAYR, R.
Herstellung und Wirkung heterologer Antilymphozytenseren.
a) Habilitationsschrift, München (1966)
b) Zeitschrift für die ges. exp. Med., 143 (1967) 161
63. PICHLMAYR, R., W. BRENDDEL, G. BECK, G. TIDOW und I. PICHLMAYR
Herstellung heterologer Immunsereen gegen Lymphozyten
des Hundes.
Klin. Wschr., 45 (1967) 199
64. PICHLMAYR, R., W. BRENDDEL und R. ZENKER
Erfahrungen mit heterologen Antilymphozytenseren beim
Menschen.
Münch. med. Wschr., 110 (1968) 893
65. PICHLMAYR, R., W. BRENDDEL, Gg. BECK, E. SCHMITTDIEL,
I. PICHLMAYR,
S. THIERFELDER, A. FATEH-MOGHADAM und W. LAND
Gewinnung von heterologen Immunsereen gegen menschliche
Lymphozyten.
Klin. Wschr., 46 (1968) 249
66. ROSE, N., S. PEETOOMS, A. RUDDY, A. MICHELI et P. GRABAR
Etude immunochemique des hémolysats de globules rouges
humains. I. Principaux constituants antigéniques.
Ann. Inst. Past., 98 (1960) 70
67. ROSS, J., E. MANGETE und K.O. VORLAENDER
Über den Nachweis von präzipitierenden Antikörpern
gegen Leukozyten-Extrakte. Experimentelle und klinische
Untersuchungen.
Klin. Wschr. 45 (1967) 522
68. RUSSEL, P.S. and A.P. MONACO
The biology of tissue transplantation.
N. Eng. J. Med. , 271 (1964) 502

69. SACKS, J.H., D.R. FILIPONE and D.N. HUNE
Studies of immune destruction of lymphoid tissue.
I. Lymphocytotoxic effect of rabbit-anti-rat-lymphocyte
antiserum.
Transplantation 2, (1963) 60
70. SCHEIDENGER, J.J.
Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse
Int. Arch. Allergy, 7 (1955) 103
71. SCHEIFFARTH, F., H.GUTZ und G. SCHERNTHANER
Immunelektrophoretische Studien zur Frage der Identität
der Organ- und Serumproteide.
Clin. Chim. acta , 6 (1961) 481
72. SCHÖNE, G.
Die heteroplastische und homöoplastische Transplantation
I.Auflage , Berlin, J. Springer (1912)
73. SCHMIDT-HEIDELBERG, F.
Antikörper, I. Teil
Fortschr. Med. , 82 (1964) 644
74. SCHWARTZ, R.S.
Immunosuppressive drugs.
Progr. Allergy , 9 (1965) 246
75. SCHWARTZ, R.S. and W. DAMASHEK
Drug induced immunological tolerance.
Nature (London) , 183 (1959) 1682
76. SCHWARTZ, R.S., A. ELSNER and W.DAMASHEK
Effect of 6-MP on primary and secondary immune response
J. Clin. Invest., 38 (1959) 1394
77. SCHWARTZ, R.S., J. STACK and W.DAMASHEK
Effect of 6-MP on antibody production
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) , 99, (1958) 164
78. STARZL, T.E., T.L.MARCHIGRO, T.D.FARIS, J.R.McCARDLE,
and Y.WASAKE
Avenues of future research in homotransplantation of the
liver.
Americ. J. Surg. , 112 (1966) 391

79. STERZL, J.
Inhibition of the inductive phase of antibody formation
by 6-MP examined by the transfer of isolated cells.
Nature (Lon.) , 185 (1960) 256
80. STERZL, J.
Study of antibody formation by the use of metabolic
inhibitors.
I. The effect of 6-MP on specific immune reactions.
Folia microbiol., 5 (1961) 364
81. STÜCKL, W.
Immunologische und elektrophoretische Serumuntersuchungen
zwecks frühzeitiger Feststellung zur Rotlaufgewinnung
geeigneter Pferde.
Zentralblatt. f. Veterinärmedizin, 1,(1953/54) 330
82. THOMAS, E.D., J.A.BAKER and J.W. FLEBEE
The effect of methotrexate on the production of antibodies
against attenuated distemper virus in the dog.
J. Immunology , 90 (1963) 324
83. TREPEL, F., R.PICHLMAYR, J. KIMURA, W. BRENDL u. H.BEGEMANN
Therapieversuche mit Antilymphozytenserum bei Autoaggressions-
krankheiten.
Klin. Wschr., 46 (1968) 856
84. TSIRIMBAS, A.D., R. PICHLMAYR, B.HORNUNG, H.PFISTERER,
St. THIERFELDER, W.BRENDEL und W.STICH
Therapeutische Wirkungen von heterologem Antihumanlympho-
zytenserum (AHLs) bei chronischer lymphatischer Leukämie.
Klin. Wschr. , 46 (1968) 583
85. ULLMANN, E.
Experimentelle Nierentransplantation.
Wiener Klin. Wschr. 15 (1902)
86. VALETTE-ROBIN, Y. N. Du PONT-MAIRESSE and R. JENNER
A relation between antibody and non-specific γ -globulin
production predictable by the clonal selection theory of
the immune reaction.
Biochem.biophys.Res.Comm., 20 (1965) 5
87. WAKEMAN, B.H., S. ARBOUYS and B.G. ARNASON
The use of specific " Lymphocyte " antisera to inhibit
hypersensitive reactions of the " delayed " type.
J. Exp. Med. , 114 (1961) 997

88. WEICHSELBAUM, T.E.
An accurate and rapid method for the determination of
proteins in small amounts of blood serum and plasma.
Amer.J. Clin. Path. 10 (1946) 40
89. WILHELM, R.E., FISHER, J.P. and R.A. COOKE
Experimental depletion of mononuclear cells for the
purpose of investigating reactions of the allergic contact
type.
J. ALLERGY, 29 (1958) 493
90. WOODRUFF, M.F.A.
Transplantation of tissues and organs, p. 100
Springfield (III) Thomas 1960
91. WOODRUFF, M.F.A. and N.F. ANDERSON
The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct
fistula and administration of antilymphocytic on the survival
of skin homografts in rats.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 120 (1964) 119
92. WOODRUFF, M. and B. FORMANN
Effect of antilymphocytic serum on suspensions of
lymphocytes in vitro.
Nature, 168 (1951) 35
93. ZENKER, R. und H. PICHLMAIER
Organverpflanzung beim Menschen
Dtsch. med. Wschr., 93 (1968) 713

V e r d a n k u n g e n

Herrn Prof. Dr. H. SCHWIEGK danke ich für die Ermöglichung, an seiner Klinik zu arbeiten.

Herrn Priv. Doz. Dr. M. KNEDEL schulde ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für zahlreiche Anregungen und eine großzügige Unterstützung bei der Ausführung meiner experimentellen Untersuchungen meinen tiefen Dank.

Herrn Prof. Dr. W. BRENDEL und Herrn Prof. Dr. R. PICHLMAYR möchte ich für die freundliche Überlassung der Untersuchungsmaterialien danken.

Für die unermüdliche und tatkräftige Hilfe sowie zahllose Anregungen während der Durchführung meiner Arbeit bin ich nicht zuletzt und ganz besonders Herrn Dr. A. FATEH-MOGHADAM zutiefst dankbar.

L e b e n s l a u f

Am 25. April 1944 bin ich, Christian Morell, als Sohn des Arztes Dr. Franz Morell und seiner Ehefrau Renate in Gießen geboren. Meine frühe Kindheit verbrachte ich in Aurach/Fischbachau in Oberbayern. 1949 ließ sich mein Vater als praktischer Arzt in Ottfingen Kreis Olpe in Westfalen nieder. Im gleichen Ort wurde ich 1950 in die katholische Volksschule eingeschult. Nach Beendigung des vierten Schuljahres besuchte ich das Städtische Neusprachliche Gymnasium in Olpe, wo ich im März 1963 meine Reifeprüfung ablegte.

Meiner Neigung zum Arztberuf folgend, immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1963 an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nachdem ich dort nach zwei Semestern die naturwissenschaftliche Prüfung und nach weiteren drei Semestern das Physikum abgelegt hatte, beabsichtigte ich, die Universität zu wechseln. Nachdem ich jedoch am Ende des sechsten Semesters in der I. Medizinischen Universitätsklinik München an meiner Doktor-Dissertation zu arbeiten begonnen hatte, ließ ich dieses Vorhaben fallen. Bis zum Beginn des zehnten Semesters arbeitete ich mit großem Interesse am experimentellen Teil meiner Dissertationsarbeit, zumal mir reichlich Gelegenheit geboten war, mich mit anderen immunologischen Fragen vertraut zu machen. Nach dem Wintersemester 1966/67 famulierte ich auf der Infektionsstation der I. Medizinischen Universitätsklinik München. Nach dem Sommersemester 1967 wählte ich bewußt die Famulatur in einem kleinen Krankenhaus in Freudenberg im Siegerland, wo ich meine

theoretischen Kenntnisse auf der inneren und der chirurgischen Abteilung praktisch anwandte.

Im Anschluß an das 6. klinische Fachsemester absolvierte ich im Winter-Semester 1968/69 meine ärztliche Prüfung. Im März 1969 ging ich als Medizinalassistent wieder nach Freudenberg, wo ich am 1. März 1970 auch meine internistische Fachausbildung begonnen habe.

Am 5. Oktober 1967 heiratete ich die Ärztin Christine Linke. Am 28. Oktober 1969 wurde uns eine Tochter, Saskia Martina, geboren.



